

In vitro Untersuchungen zur
experimentellen Induktion
der Merozoitenbildung bei
Theileria annulata
(Apicomplexa, Sporozoea)

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie an der
Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Frank-Michael Fritsch
aus Köln

Bochum 1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

In vitro Untersuchungen zur
experimentellen Induktion
der Merozoitenbildung bei
Theileria annulata
(Apicomplexa, Sporozoea)

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie an der
Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Frank-Michael Fritsch

aus Köln

Bochum 1989

Referent : Herr Prof. Dr. H. Mehlhorn
Koreferent : Herr Prof. Dr. M. Hauser

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Mai 1989

- Meiner Familie gewidmet -

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	Zusammenfassung.....	1
2.	Einleitung.....	3
2. 1.	Systematische Stellung, Vorkommen und Vektoren.	3
2. 2.	Lebenszyklus.....	5
2. 3.	In vitro Züchtung.....	7
2. 4.	Probleme der Chemotherapie.....	8
2. 5.	Möglichkeiten einer Immunisierung.....	9
2. 6.	Ziele.....	10
3.	Material und Methoden.....	11
3. 1.	Gewinnung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut.....	11
3. 2.	Isolierung von <u>T. annulata</u> Sporozoiten aus Zecken.....	11
3. 3.	In vitro Infektion gereinigter Lymphozyten mit <u>T. annulata</u> Sporozoiten.....	12
3. 4.	In vitro Haltung <u>Theileria</u> -infizierter Lymphoblasten.....	12
3. 5.	Blut- und Erythrozyten-Kulturen.....	13
3. 6.	Bestimmung der Kulturcharakteristika.....	13
3. 7.	Kryokonservierung.....	15
3. 8.	Versuchsanordnung.....	16
3. 9.	Lichtmikroskopische Methoden.....	16
3.10.	Elektronenmikroskopische Methoden.....	17

	Seite
4. Ergebnisse.....	18
4. 1. Charakteristika unbehandelter, <u>T. annulata</u> -infizierter Lymphoblasten.....	18
4. 2. Kryokonservierung.....	27
4. 3. Einfluß verschiedener Substanzen auf die Schizonten von <u>T. annulata</u> und deren Wirtszellen in vitro.....	28
4. 3.1. Substanzen mit inhibierender Wirkung.....	28
4. 3.2. Substanzen mit potentiell stimulierender Wirkung.....	54
4. 4. Temperaturabhängige Induktion der Merozoiten- bildung bei <u>T. annulata</u> in vitro.....	61
4. 5. In vitro Infektion von Rindererythrozyten durch in vitro gebildete Merozoiten.....	74
4. 6. Einfluß verschiedener Substanzen auf die Merozoitenbildung und die Erythrozyteninfek- tion in vitro.....	79
4. 6.1. Substanzen mit inhibierender Wirkung.....	79
4. 6.2. Substanzen mit potentiell stimulierender Wirkung.....	82
4. 6.3. Optimiertes RPMI-Vollmedium.....	85
5. Diskussion.....	88
6. Abkürzungsverzeichnis.....	110
7. Literaturverzeichnis.....	112
8. Danksagung.....	123
9. Lebenslauf.....	124

1. ZUSAMMENFASSUNG

Theileria annulata, ein parasitischer Vertreter der Protozoen, verursacht bedeutende wirtschaftliche Verluste bei Hausrindern und Büffeln in den subtropischen Gegenden. Schildzecken der Gattung Hyalomma dienen als Vektoren. Von den drei Phasen des Lebenszyklus - Sporogonie, Schizogonie und Gamogonie - findet die Schizogonie in den Blutzellen des Wirbeltierwirtes statt und führt bei diesen zu hohen Mortalitätsraten. Eine praktische, in den Hauptverbreitungsgebieten anwendbare Chemotherapie besteht ebenso wenig wie eine wirksame Immunisierung. Ein Impfstoff gegen freie Merozoiten würde eine Ausbreitung der Infektion unterbinden. Experimente mit diesem Ziel konnten bisher nicht unternommen werden, da ausreichende Mengen freier Merozoiten in vivo nicht isoliert werden konnten und in vitro Merozoiten nicht auftraten.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Merozoitenbildung in vitro induzierbar ist und inwieweit der Einfluß verschiedener inhibierender und stimulierender Substanzen diese beeinflußt.

Die untersuchten Zellen besaßen eine Generationszeit von 17 - 20 h; 95 % der Zellen waren parasitiert und enthielten durchschnittlich $13 \pm 4,5$ Schizontenkerne pro Wirtszelle. Die Experimente ergaben, daß durch Substanzen, welche die Teilung der Wirtszellen inhibierten, wie Colchicin, Taxol, Polyethylenglykol, Dinitrophenol, Coffein, Natriumazid, Obioactin, TLA und Glucocorticosteroide, bei 37 °C nur in einigen Fällen die Anzahl der Schizontenkerne signifikant angestiegen war. Eine Merozoitenbildung konnte aber nicht induziert werden.

Stimulierende Substanzen, wie Aminosäuren, ATP, Calmodulin, Glucose, Insulin, Nucleinsäuren und Transferrin, führten zwar teilweise zu verbesserten Wachstumsbedingungen, konnten aber auch keine Merozoitenbildung bei 37 °C induzieren. Dies gelang erst durch die Erhöhung der Versuchs-

temperatur auf 41 °C. Die Schizontenkernzahl stieg auf über 85 pro Wirtszelle an, und ab dem 4. Tag konnten Merozoiten in den Ausstrichen gefunden werden. Elektronenmikroskopisch zeigten diese in vitro gebildeten Merozoiten keine Unterschiede zu in vivo gebildeten. Durch die Zugabe von Blut wurde nachgewiesen, daß es sich um reife und infektiöse Stadien handelte. Nach 48 h traten regelmäßig bis zu 1 % befallene Erythrozyten auf. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, das es sich hierbei eindeutig um morphologisch intakte intraerythrozytäre Stadien von Theileria handelte. Mit zunehmendem Alter der Kultur ließ die Fähigkeit zur Merozoitenbildung nach, eine Kryokonservierung beeinträchtigte sie hingegen nicht.

Die Bildung von Merozoiten und intraerythrozytären Stadien ließ sich nicht synchronisieren. Nach Optimierung des Mediums mittels verschiedener Substanzen und der Erhöhung des FCS-Anteils konnte die Ausbeute gesteigert werden. Maximal wurden etwa 7 % Merozoitenbildung und etwa 2 % befallene Erythrozyten erreicht.

Die Merozoitenbildung von T. annulata konnte in vitro induziert werden. Dies bedeutet eine weitere Vervollständigung des Lebenszyklus in vitro und ermöglicht neue Perspektiven für die Entwicklung einer Vakzine gegen dieses Stadium.

2. EINLEITUNG

2.1. Systematische Stellung, Vorkommen und Vektoren

Theileriosen gehören zu den volkswirtschaftlich bedeutenden Parasitosen, für die es bisher, trotz umfangreicher morphologischer und epidemiologischer Kenntnisse und zunehmendem Verständnis der immunologischen Wechselwirkungen, nicht gelungen ist, befriedigende Therapie- und Kontrollmöglichkeiten zu entwickeln.

Die Vertreter der Gattung Theileria rufen Infektionen des Lymph- und Blutsystems verschiedener Wiederkäuerarten hervor.

Die bedeutendsten Arten der Gattung Theileria sind T. parva Theiler 1904 und T. annulata Dschunkowsky und Luhs 1904 (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Pathogene Arten der Gattung Theileria
(nach Mehlhorn und Schein 1984).

Art	Vektorzecken	Wirbeltierwirts	Krankheit
<u>T. parva parva</u>	<u>Rhipicephalus</u> spp.	Hausrind, Büffel	Ostküstenfieber
<u>T. p. lawrencei</u>	<u>Rhipicephalus</u> spp.	Hausrind, Büffel	Corridor disease
<u>T. annulata</u>	<u>Hyalomma</u> spp.	Hausrind, Wasserbüffel	Mittelmeerküstenfieber
<u>T. hirci</u>	<u>Hyalomma</u> spp.	Ziege, Schaf	bösartige Theileriose



Die systematische Stellung der Gattung Theileria im Stamm SPOROZOA (APICOMPLEXA) zur Klasse SPOROZOEAE ist aufgrund der ultrastrukturellen Merkmale allgemein anerkannt. Die nachfolgenden Taxa können folgendermaßen zugeordnet werden: Die Familien PIROPLASMIDAE (Gattungen Theileria und Babesia) und HAEMOSPORIDAE (u.a.

Gattung Plasmodium) werden aufgrund morphologischer und biologischer Gemeinsamkeiten in der Unterordnung ACNIDINA vereinigt (Mehlhorn 1988). Zusammen mit der Unterordnung CONIDINA bilden sie die Ordnung HAEMOSPORIDA. Diese wiederum wird in der Überordnung EUCOC-CIDEA mit der Ordnung EUCCIDIDA vereint und in der Unterklasse COCCIDIA der Klasse SPOROZOEAE zugeordnet.

Das Hauptverbreitungsgebiet der T. parva-Infektion (Ostküstenfieber) ist Ost-, Zentral- und Südafrika. Das Mittelmeerküstenfieber (Tropische Theileriose) ist nicht nur im Mittelmeergebiet verbreitet, sondern erstreckt sich auch über Südosteuropa, den mittleren Osten, UdSSR, Indien und China.

Dabei ist das Vorkommen der Theileriosen an die geographische Verbreitung ihrer Vektoren, ixodide Zecken aus den Gattungen Rhipicephalus, Hyalomma, Amblyomma und Haemaphysalis, gebunden.

Bedeutung bekommen diese Erkrankungen durch die hohen Mortalitätsraten bei heimischen und importierten Nutztieren. Sie kann 50 - 100 % bei T. parva und bis über 90 % bei T. annulata betragen. Nach neueren Schätzungen (Dyer und Tait 1987) sind im Verbreitungsgebiet weit mehr als 200 Millionen Rinder durch T. annulata gefährdet. Die ersten Symptome sind Lymphknotenschwellungen und Fieber. Die Körpertemperatur kann während der Erkrankung auf 41 °C ansteigen. Kurz vor dem Tod fällt sie jedoch wieder ab. Weitere Symptome sind Anämie aufgrund der starken Lymphozytenproliferation, Ikterus und Diarrhöe. Später können Nieren-Infarkt und Lungenödem hinzu-

kommen. Die häufigste Todesursache ist aber das Versagen des Atemsystems (Levine 1973; Irvin und Young 1980). Bei Wildtieren im Endemiegebiet verläuft die Erkrankung überwiegend subakut. Latent infizierte Tiere dienen daher als Haupterregerreservoir (Samish und Pipano 1976), an denen sich die Vektoren erneut infizieren können.

2.2. Lebenszyklus

Theileria-Arten haben einen obligaten heteroxenen Lebenszyklus, der aus Sporogonie, Schizogonie und Gamogonie besteht (s. Abb 1).

Vektoren sind Schildzecken aus verschiedenen Gattungen. Beim Saugen der Zecken wird eine große Zahl von 1 μm großen Sporozoiten (Abb. 1.1) in die Blutbahn von Rindern injiziert. Diese dringen innerhalb von 10 Minuten in Lymphozyten ein. Jeder Sporozoit bildet nach ca. 3 Tagen einen mehrkernigen Schizonten (Abb. 1.2).

Durch den Theileria-Befall werden die Lymphzellen zu Lymphoblasten transformiert. Die Vermehrung des Parasiten ist mit der Teilung der Wirtszelle gekoppelt, so daß es zu einem starken Anstieg Schizonten enthaltender Lymphozyten kommt.

Diese mehrkernigen sogenannten "Makroschizonten" sind etwa 10-15 μm groß und in Blutaussstrichen nachweisbar. Sie bilden etwa ab dem achten Tag Merozoiten (Abb. 1.3). Aufgrund der Abschnürungen erscheinen die Schizonten nun kleiner und werden auch als "Mikroschizonten" bezeichnet. Die ca. 1 μm großen Merozoiten penetrieren Erythrozyten (Abb. 1.4) und bringen nach Längsteilung (Abb. 1.5) ovoide Stadien, sogenannte Gamonten (Abb. 1.6), hervor. Diese etwa 4 μm großen Stadien werden beim Blutsaugen von Nymphen aufgenommen. Im Darm der Larve differenziert sich ein Teil der Gamonten zu Strahlenkörpern (Abb. 1.8,9) und weiter zu Mikrogameten (Abb. 1.10). Andere bleiben ovoid und werden als Makrogameten (Abb. 1.7,11) angesehen. Aus jeder etwa

THEILERIA

1

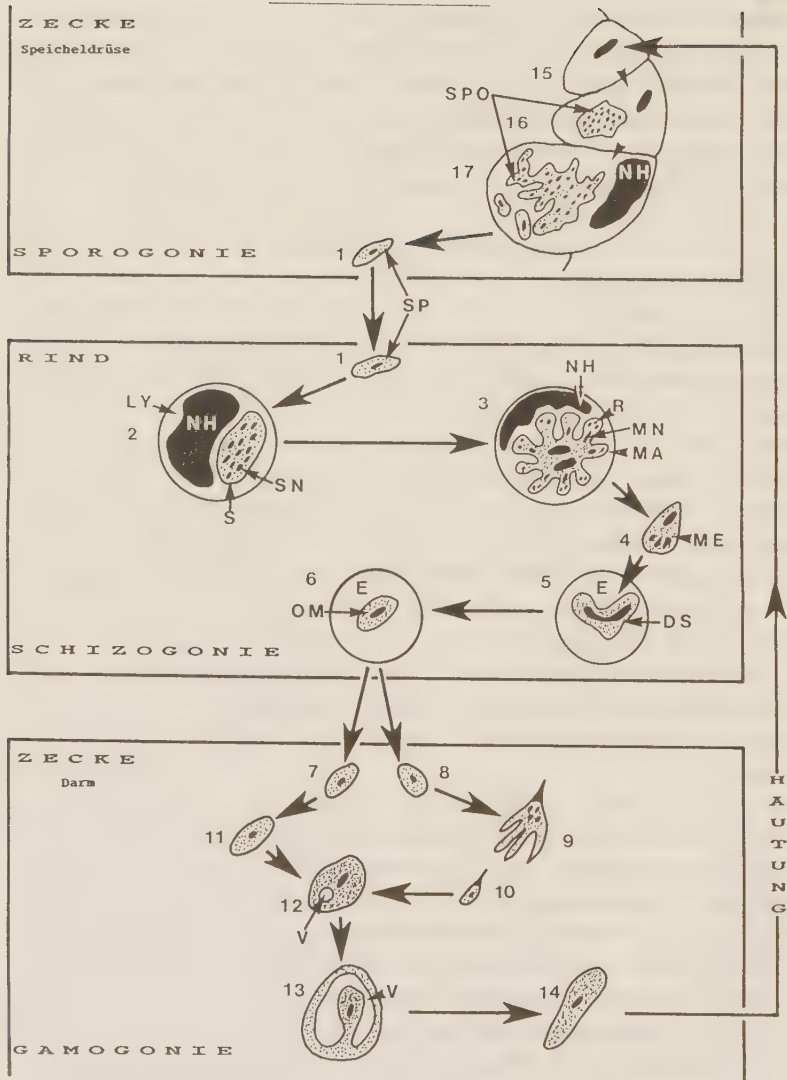


Abbildung 1: Lebenszyklus von *Theileria*.
 (nach Mehlhorn und Schein, 1984) Text s. 2.2. DS=Intra-erythrozytäre Längsteilung, LY=Lymphozyte, MA=Merozoitenanlage, ME=Merozoit, MN=Kern des Merozoiten, NH=Kern der Wirtszelle, OM=Ovoides Stadium, R=Rhoptrie, S=Schizont, SN=Kern des Schizonten, SP=Sporozoit, SPO=Sporont, V=Vakuole.

10 µm großen Zygote (Abb. 1.12) entwickelt sich im Darmepithel ein bewegliches Stadium (Abb. 1.13), das als Kinet (Abb. 1.14) bezeichnet wird. Dieser ca. 17 µm lange Kinet hat bei T. annulata nur einen Kern, bei T. parva kann die Kernvermehrung schon im Kineten begonnen haben. Nach der Häutung der Zecke dringen die Kineten in die Zellen der Speicheldrüsen ein (Abb. 1.15) und bilden dort vielkernige Sporonten (Abb. 1.16), von denen sich mehr als 100.000 Sporozoite pro Zelle abschnüren (Abb. 1.17), die mit dem Speichel bei der Blutmahlzeit übertragen werden.

2.3. In vitro Züchtung

Tsur berichtete als erster über die erfolgreiche Züchtung von T. annulata-Schizonten und Wirtszellen in vitro (Tsur 1945; Tsur und Adler 1962; 1965).

Die Vermehrung und Verteilung der Schizonten auf die Tochterlymphozyten wurde von Hulliger und Mitarbeitern in vitro demonstriert (Hulliger et al. 1964).

Durch den Theileria-Befall wird die Wirtszellmitose stimuliert. Dies führt zu einer, gelegentlich inäqualen, Verteilung der Schizontenkerne auf die Tochterlymphozyten. Die zu Lymphoblasten transformierten Wirtszellen behalten ihre Teilungsfähigkeit, so lange sie parasitiert sind. Die Einführung von "feeder layers" (Hulliger 1965) und fötalem Kälberserum (Malmquist et al. 1970) ermöglichte auch die in vitro Haltung von T. parva.

Aufgrund der fortgeschrittenen Zellkulturtechniken und der Verfügbarkeit komplexer Medien kann das intralymphozytäre Schizontenstadium von T. annulata und T. parva kontinuierlich in vitro gehalten werden (Brown 1987). Eine Merozoitenbildung wurde in solchen Kulturen bisher aber nur gelegentlich bei T. parva-Kulturen beobachtet (Hulliger et al. 1966; Danskin und Wilde 1976; Nyindo et al. 1978).

Auch in den von Conrad et al. (1985) beschriebenen in vitro Experimenten mit infizierten Erythrozyten konnte nur die Teilung der Parasiten beobachtet werden, nicht aber eine Neuinfektion parasitenfreier Erythrozyten. Von den Zecken-Stadien war bisher nur die Bildung von T. annulata Kineten in vitro erfolgreich (Bell 1984). Die in vitro Infektion und Züchtung von Theileria-Kulturen erlaubte neben morphologischen Studien auch Untersuchungen über Möglichkeiten einer Chemotherapie beziehungsweise Immunisierung (s. u.).

2.4. Probleme der Chemotherapie

Aufgrund der großen wirtschaftlichen Verluste besteht ein Interesse an einer wirksamen Kontrolle und Therapie der Erkrankung. Neben einer Vektorbekämpfung mit Acariciden (Tatchell 1987) wurden vielfältige Versuche zur Chemoprophylaxe und Chemotherapie unternommen (Wilde 1967).

Neitz (1953) konnte bei T. p. parva zeigen, daß Chlor-tetracycline die Schizogonie unterbinden. Oxytetracycline finden ihren Einsatz in Kombination mit Immunisierungsversuchen (s. 2.5.). Allerdings bleiben die Tetracycline nach Ausbruch der Infektion wirkungslos.

Andere Coccidostatika, Babesicide und Malaricide wurden auf ihre Wirksamkeit gegen Theileria-Infektionen untersucht. Dabei erwiesen sich Hydroxynaphthoquinon-Derivate als wirksam. So konnte McHardy et al. (1976) die theilericide Wirkung von Menocton in vitro nachweisen. Das weniger toxische Parvaquon ersetzte später Menocton (Raether 1988). Vielversprechend erscheint auch das bei T. p. parva 20fach wirksamere Buparvaquon. Dessen Wirkung gegen T. annulata übertrifft allerdings die Parvaquon Wirkung nicht (McHardy et al. 1985).

Ebenfalls wirksam, in vitro wie in vivo, erwies sich das Quinazolinon-Derivat Halofuginon. Im Frühstadium behandelte Tiere waren immun gegen homologe Stämme des Erregers

(Schein und Voigt 1979; Uilenberg 1980). Mehlhorn und Mitarbeiter (1981) konnten zeigen, daß die Wirkung auf einer Lyse der Wirtszellen beruht. Die so freigesetzten Schizonten degenerierten dann außerhalb der Wirtszellen. Die Einsatzmöglichkeiten aller Chemotherapeutica bleibt aber unbefriedigend, da eine etablierte Infektion nicht kuriert werden kann. Zudem ist ihr Einsatz kostenintensiv und an die Möglichkeit einer klinischen Überwachung der Behandlung gebunden. Die praktische Verwendungsmöglichkeit ist somit in den betroffenen Gebieten stark eingeschränkt (Schein und Voigt 1981; McHardy und Morgan 1985; Dolan 1986).

2.5. Möglichkeiten einer Immunisierung

Für T. annulata-Infektionen besteht eine effektive Immunisierungsmöglichkeit mittels attenuierter Schizonten aus Zellkulturen. Diese ist in Israel weit verbreitet (Pipano 1981).

Bei den T. parva-Stämmen scheint zur Zeit die beste Immunisierungsmethode eine Infektion mit lebenden Sporozoiten bei gleichzeitiger Chemoprophylaxe mit Oxytetracyclinen zu sein (Dolan et al. 1984). Die bei dieser Methode entstehende stammspezifische Immunität konnte teilweise mittels einer Kombinationsvakzine aus mehreren Stämmen umgangen werden (Uilenberg et al. 1977).

Allen Immunisierungen gemeinsam ist aber, daß sie keinen hundertprozentigen Schutz bieten. Außerdem sind sie an bestimmte technische Einrichtungen gebunden. Der praktische Einsatz ist aus diesen Gründen stark begrenzt (Dolan 1987).

Neben den Sporozoiten und den Schizonten tritt im Wirbeltierwirt ein drittes Stadium auf, das sich als Ziel für Immunisierungsversuche eignen würde: die Merozoiten.

Ein durch eine Merozoitenvakzine erlangter Schutz würde die Bildung von intraerythrocytären Stadien ver-

hindern. Damit wäre eine erneute Infektionsmöglichkeit für Vektoren nicht vorhanden. Dies wäre aber, besonders in Verbindung mit den zur Zeit vorhandenen Immunisierungsmethoden, wünschenswert. Bei diesen Immunisierungen wird ja immer eine Infektion induziert. Das immune Tier bleibt somit zeitlebens Reservoir für eine erneute Vektorinfektion (Irvin 1985).

Das Haupthindernis für Versuche mit den Merozoitenstadien besteht darin, daß diese nicht in ausreichenden Mengen zu erhalten sind. Eine Möglichkeit, reproduzierbar Merozoiten und intraerythrozytäre Stadien in vitro zu erhalten, bestand bisher weder für T. annulata noch für die T. parva-Gruppe (Morrison et al. 1986).

2.6. Ziele

Wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Immunisierung wäre es daher, ausreichende Mengen an Merozoiten für Experimente zu erhalten. Diese lassen sich aber nicht aus infizierten Tieren isolieren. Als einzige Möglichkeit verbleibt daher, die Merozoiten in Zellkulturen zu produzieren. Bisher war jedoch eine kontinuierliche und regelmäßige Merozoitenbildung in vitro weder bei T. parva noch bei T. annulata beobachtet worden.

Ziel dieser Arbeit war es also, zu untersuchen, ob die Merozoitenbildung bei T. annulata experimentell in vitro induzierbar ist. Darüber hinaus war die Infektiosität dieser Merozoiten in vitro zu überprüfen. Die reproduzierbare Merozoitenbildung in vitro würde die Grundlage für Immunisierungsversuche gegen dieses Stadium schaffen. Eine Merozoitenvakzine könnte, in Kombination mit den derzeitigen Methoden, zu einem umfassenden Immunschutz gegen diese Protozoeninfektion führen.

3. Material und Methoden

3.1. Gewinnung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut

In vitro, wie in vivo, dringen die Sporozoiten von T. annulata in die Lymphzellen des peripheren Blutsystems, der Lymphknoten oder der Milz ein. Für diese Untersuchungen wurden 20 ml Blut aus der Jugularvene eines nachweislich nicht Theileria-infizierten Kalbes steril entnommen. Das heparinisierte Blut (10 IU/ml) wurde 1:1 mit steriler 0,8 %iger NaCl-Lösung verdünnt. Die Reinigung der Lymphozyten erfolgte nach einer Methode von Boyum (1968) mittels Dichtegradientenzentrifugation auf Ficoll Paque[®] (Pharmacia). Dazu wurden 3 ml Ficoll Paque[®] mit 4-5 ml Blut-NaCl-Lösung in einem Zentrifugenröhrchen überschichtet und 30 min bei 400 g und 20 °C zentrifugiert. Die opal erscheinenden Lymphozytenbanden wurden vereinigt und mit RPMI 1640 Medium (Flow) 2-3 mal 10 min bei 150 g und 4 °C gewaschen. Nach dem Lösen des Pellets mit 1 ml Vollmedium (s. 3.4.), wurde in einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt und auf 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt (Brown 1987).

3.2. Isolierung von T. annulata Sporozoiten aus Zecken

Der T. annulata-Stamm Ankara wurde 1971 aus einem natürlich infizierten Rind aus der Umgebung von Ankara/Türkei isoliert. Danach wurde die Infektion durch den Laborstamm Hyalomma anatolicum excavatum übertragen (Schein et al. 1975).

Zehn infizierte H. a. excavatum wurden nach der Häutung an einem Kaninchen gefüttert. 4-5 Tage nach dem Festsaugen wurden die Zecken abgenommen, 5 min in

70 %igem Ethanol gereinigt und in steriler NaCl-Lösung (0,8 %), ergänzt mit 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, präpariert. Die Speicheldrüsen wurden in Vollmedium mit einem Glashomogenisator aufgebrochen (Schein 1976).

3.3. In vitro Infektion isolierter Lymphozyten mit T. annulata Sporozoiten

0,1 ml der so gewonnenen Sporozoiten-Suspension wurde mit 1 ml der Lymphozyten-Präparation (s. 3.1.) vereinigt und 24-72 h bei 37 °C in einer 5 % CO₂-Luft Atmosphäre (95 % rel. Luftfeuchte) inkubiert (Brown et al. 1973, Brown 1979). Danach wurden die Zellen mit frischem Vollmedium in 25 cm² Zellkulturflaschen (Nunc) überführt.

3.4. In vitro Haltung Theileria-infizierter Lymphoblasten

Die so erhaltenen, nach *Theileria*-Befall zu Lymphoblasten transformierten Zellen, wurden bei 37 °C ± 2 °C gezüchtet. Eine 5 % CO₂-Luft Atmosphäre erwies sich 3-4 Wochen nach der Transformation, oder bei der Verwendung HEPES-gepufferter Medien, nicht mehr als notwendig (Brown 1983).

Das verwendete Vollmedium bestand aus :

RPMI 1640 mit 2,0 g/l Bicarbonat (Flow, Gibco)
Fötalem Kälberserum 10 % (Flow, Gibco)
Penicillin 100 IU/ml (Flow)
Streptomycin 100 µg/ml (Flow)
Amphotericin B 2,5 µg/ml (Flow)
L-Glutamin 2 mmol/l (Flow).

Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7,2 eingestellt (Moore et al. 1967). In einigen Versuchen und für die Stamm-

haltung konnte das fötale Kälberserum durch Serum von Neugeborenen ersetzt werden. Das Medium wurde dreimal pro Woche in 48-72 h Intervallen erneuert. Dabei wurden 1-2 mal wöchentlich Subkulturen angelegt. Für die sterilen Arbeitsvorgänge stand ein Laminar Air Flow (Flow) zur Verfügung.

3.5. Blut- und Erythrozyten-Kulturen

Nach der Bildung freier Merozoiten (s. 4.4.) wurde den Lymphoblasten-Kulturen Blut oder gereinigte Erythrozyten von Rindern zugegeben. Dazu wurde ein Lymphoblasten Monolayer mit 0,5 - 1 ml frischem, heparinisiertem Blut oder mit gereinigten Erythrozyten überschichtet. Erythrozyten wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Dazu wurde frisches, heparinisiertes Blut 1:1 mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS : NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,44 g/l, KH_2PO_4 0,2 g/l, pH 7,2) verdünnt und wie bei 3.1 beschrieben behandelt. Nach zweimaligem Waschen des Erythrozyten-Pellets (RPMI, 10 min, 100 g, Raumtemperatur) ergab die lichtmikroskopische Kontrolle eine annähernd reine Erythrozyten-(Granulozyten-)Suspension. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37 °C oder 41 °C in einer 5 % CO_2 -Luft Atmosphäre oder nach der candle-jar-Methode (Jensen und Trager 1977). Das Vollmedium mußte 1 oder 2 mal täglich teilweise ausgetauscht werden.

3.6. Bestimmung der Kulturcharakteristika

Teilungsrate und Zellzahl

Zur Ermittlung der Teilungsraten und der Verdoppelungszeiten wurden Subkulturen mit 10^5 Zellen/ml angelegt. Nach bestimmten Zeiten (i.allg. nach 24, 48, 72, 96, 120 h) wurden die Zellen trypsinisiert (Trypsin/EDTA

0,05 % / 0,02 % in PBS pH 7,2 (Flow), 5 min, 37 °C) (Lindl und Bauer 1987). Nach dem Abzentrifugieren (150 g, 10 min) wurde die Zellzahl in einem Hämocytometer bestimmt. Es wurden nur lebende Zellen (Trypan-Blau Ausschlußtest (Sigma)) berücksichtigt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus zehn Zählungen $\pm$ Standardabweichung. Parallel wurde die Zellzahl auf definierten Flächen (1 mm^2) in den Kulturflaschen mit Hilfe eines Inversmikroskops (Olympus IMT-2, Wild M40) bestimmt. Die Ergebnisse der Zählung stellen Mittelwerte aus mindestens fünf Zählungen pro Kulturflasche $\pm$ Standardabweichung dar.

Prozentualer Anteil infizierte Zellen (PIZ)

An Giemsa gefärbten Ausstrichen (s. 3.8.) wurde der prozentuale Anteil infizierter Zellen bestimmt. Dazu wurden 200 Zellen je Ausstrich in allen Versuchen und Kontrollen sowie bei jeder zehnten Passage ausgezählt (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung).

Mitoseindex (Mi)

Der prozentuale Anteil sich in Mitose (Prophase-Metaphase) befindender Lymphozyten wurde an 200 Zellen je Ausstrich (Giemsa gefärbt) ausgezählt (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung).

Durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle (DSW)

Die Anzahl der Schizontenkerne pro Wirtszelle wurde an Giemsa gefärbten Ausstrichen ermittelt. Dabei wurden in allen Versuchen, Kontrollen und in jeder zehnten Subkultur je Ausstrich 50 einkernige Wirtszellen berücksichtigt (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung). Damit konnten Schizontenkern-Anreicherungen durch unvollständige Teilungen der Wirtszelle ausgeschlossen werden.

Prozentualer Anteil merozoitenbildender Wirtszellen und intraerythrozytärer Stadien

An 1000 infizierten Lymphoblasten pro Giemsa gefärbtem Ausstrich wurde der prozentuale Anteil der Schizonten bestimmt, die sich in der Phase der Merozoitenbildung befanden. Zur Bestimmung des Anteils intraerythrozytärer Stadien wurden 1000 Erythrozyten pro Ausstrich berücksichtigt (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung).

3.7. Kryokonservierung

Nach verschieden langer Subkultivierung wurden Theileria-infizierte Lymphoblasten in flüssigem Stickstoff eingelagert. Die abzentrifugierten Zellen wurden auf $2 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ Zellen/ml RPMI-Vollmedium eingestellt.

0,5 ml Zellsuspension wurden mit 0,5 ml Vollmedium, das 15 % DMSO oder 20 % autoklaviertes Glycerin enthielt, gemischt. In Kryoröhrchen (Nunc) wurden die Zellen für 1 h bei -30°C vorgefroren. Anschließend erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff. Alternativ wurden die Zellen direkt für 2 h in die Gasphase über dem flüssigem Stickstoff (-150°C) verbracht. Danach erfolgte die Lagerung in flüssigem Stickstoff. Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst schnell in einem 37°C Wasserbad. Unmittelbar nach dem Auflösen des letzten Eisklumpens wurde der Inhalt des Kryoröhrchens mit 5 ml 37°C warmem RPMI-Vollmedium gewaschen (300 g, 5 min) und in 10 ml warmen RPMI aufgenommen. 1 ml Aliquots für Trypanblau-Zählung wurden entnommen, nochmals gewaschen und in eine 25 cm^2 Kulturflasche überführt. Nach dem Festsetzen der Zellen, spätestens aber nach 24 h (DMSO) bzw. 48 h (Glycerin), wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt.

3.8. Versuchsanordnung

Der Einfluß verschiedener Substanzen auf T. annulata-Schizonten und ihre Wirtszellen wurde in vitro untersucht. Dabei wurden jeweils verschiedene Kombinationen von Konzentration und Einwirkzeit getestet.

Die Experimente erfolgten bei 37 °C und bei 41 °C. Die Substanzen wurden im allgemeinen in PBS, RPMI oder DMSO gelöst. Falls notwendig, wurde steril filtriert (0,2 µm Porengröße, Einmalfilter, Schleicher & Schuell) oder, wenn möglich, autoklaviert und dem RPMI-Medium zugesetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde überprüft und gegebenenfalls auf pH 7,2 korrigiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und auf 1×10^6 /ml eingestellt. Bei Versuchen mit Mitogenen betrug die Ausgangszellzahl 1×10^5 /ml. Bei längeren Inkubationszeiten wurde spätestens nach 48 h bzw. 72 h das Medium erneuert. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Zellen mit einer Pasteur-Pipette abgelöst und zentrifugiert. Von dem Pellet wurden Aliquots für Ausstriche entnommen, der Rest wurde für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen fixiert (s. 3.10.).

3.9. Lichtmikroskopische Methoden

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden von den pelletierten Zellen Ausstriche angefertigt. Die luftgetrockneten, mit Methanol (10 min) fixierten Ausstriche wurden Giemsa gefärbt (Romeis 1968). Dazu wurde eine 3 %ige Verdünnung der Stammlösung nach Giemsa (Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung, Merck) in Weise-Puffer (0,49 g KH_2PO_4 ; 1,14 g Na_2HPO_4 ; Aqua bidest ad 1 l; pH 7,2) unmittelbar vor dem Färben frisch hergestellt. Die Ausstriche wurden 10 - 15 min gefärbt, mit Weise-Puffer abgespült, luftgetrocknet und mit Eukitt (Merck) eingedeckt.

Für die lichtmikroskopischen Auswertungen und Messungen

stand ein Leitz SM Lux Mikroskop mit Meßokular zur Verfügung. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen entstanden mit einem Leitz Orthomat Fotomikroskop bzw. einem Olympus BH-2 auf Ilford Pan FP4 oder Kodak Panatomic X bzw. T-Max 100 (SW-Filme), oder sie wurden auf Kodak EPT 160 Kunstlicht Farbdiafilm aufgenommen.

3.10. Elektronenmikroskopische Methoden

Zur ultrastrukturellen Untersuchung wurden die Zellproben nach dem Abzentrifugieren in 5 % Glutaraldehyd (v/v) in 0,1 mol/l Natrium-cacodylat-Puffer pH 7,4 für mindestens 24 h vorfixiert. Nach viermaligem Waschen in Na-cacodylat-Puffer wurde für 2 h mit Osmiumtetroxid (OsO_4 , 2%) und Hexacyanoferrat ($\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$, 0,8 %) in Na-cacodylat-Puffer (0,1 mol/l) nachfixiert (White et al. 1979). Die Proben wurden 4-5 mal gewaschen und in 10 %-Stufen bis zum 70 %igen Ethanol überführt. Die Blockkontrastierung erfolgte auf dieser Stufe mit Phosphorwolframsäure ($\text{H}_2(\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 %) und Uranylacetat ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 %) für 12 h bei 4 °C. Anschließend wurden die Proben in einer Ethanolreihe (90 %, 96 %, 100 % wasserfrei) entwässert. Zunächst wurde über zwei Stufen in Propylenoxid überführt, das dann stufenweise gegen Araldit (Ciba Geigy) ausgetauscht wurde. Die Polymerisation erfolgte für 12 h bei 45 °C und anschließend für drei Tage bei 60 °C. Ein Teil der Blutproben wurde in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert und in ERL (epoxy resin of low viscosity) (Serva) nach Spurr (1969) eingebettet. Die anschließende Polymerisation dauerte 16 h bei 70 °C. Ultradünnschnitte wurden mit Glasmessern an einem Reichert Jung Ultracut E angefertigt und mit gesättigter ethanolischer Uranylacetatlösung (25 min) und mit Bleicitrat ($\text{Pb}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 30 min) nach Venable und Coggeshall (1965) kontrastiert. Die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte an einem Zeiss EM 9 S2.

4. Ergebnisse

4.1. Charakteristika unbehandelter, *T. annulata*- infizierter Lymphoblasten

Lymphozyten, die durch einen Befall mit *T. annulata* zu Lymphoblasten transformiert waren, zeigten unter den gegebenen Kulturbedingungen in vitro ein exponentielles Wachstum (s. Abb. 2). Die durchschnittliche Generationszeit betrug 17-20 h.

Die Ergebnisse der Hämocytometer-Zählungen lagen, methodisch bedingt, immer unter denen der Zellzahlbestimmungen in den Kulturflaschen. Sie waren jedoch von diesen bis 96 h nicht signifikant verschieden. Nach diesem Zeitpunkt waren jedoch, aufgrund der hohen Zellzahlen in den Kulturflaschen, keine hinreichend exakten Bestimmungen des Wachstumsverlaufs mehr möglich. Die Hämocytometer-Zählungen konnten dagegen noch bis 120 h fortgesetzt werden. Durch die regelmäßigen Subkultivierungen wurde das exponentielle Wachstum der Kulturen erhalten. Der prozentuale Anteil lebender Zellen nach dem Trypanblau-Ausschluß-Test lag über 90 %. Nur diese Kulturen wurden für die Versuche und Kontrollen verwendet (s. Abb. 4A,B und 5A,B).

In Tabelle 2 sind die weiteren Kulturparameter aufgeführt. Der Anteil parasitierter Lymphozyten (PIZ) lag im Mittel bei 95 % (s. Abb. 3). Die durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle (DSW) betrug ab Passage 5 $13,0 \pm 4,5$. In der Startphase der Kultur (bis Passage 4) lag sie deutlich darunter.

Der an Giemsa-gefärbten Ausstrichen ermittelte Mitoseindex (Mi) erreichte durchschnittlich $5,5 \pm 1,2$ %.

Ein Einfluß des Kulturalters (Anzahl der Subkulturen) konnte nicht festgestellt werden. Kulturen mit Passage-Nummern von 100 unterschieden sich nicht signifikant in ihren Werten von Kulturen mit Passage-Nummern zwischen

2

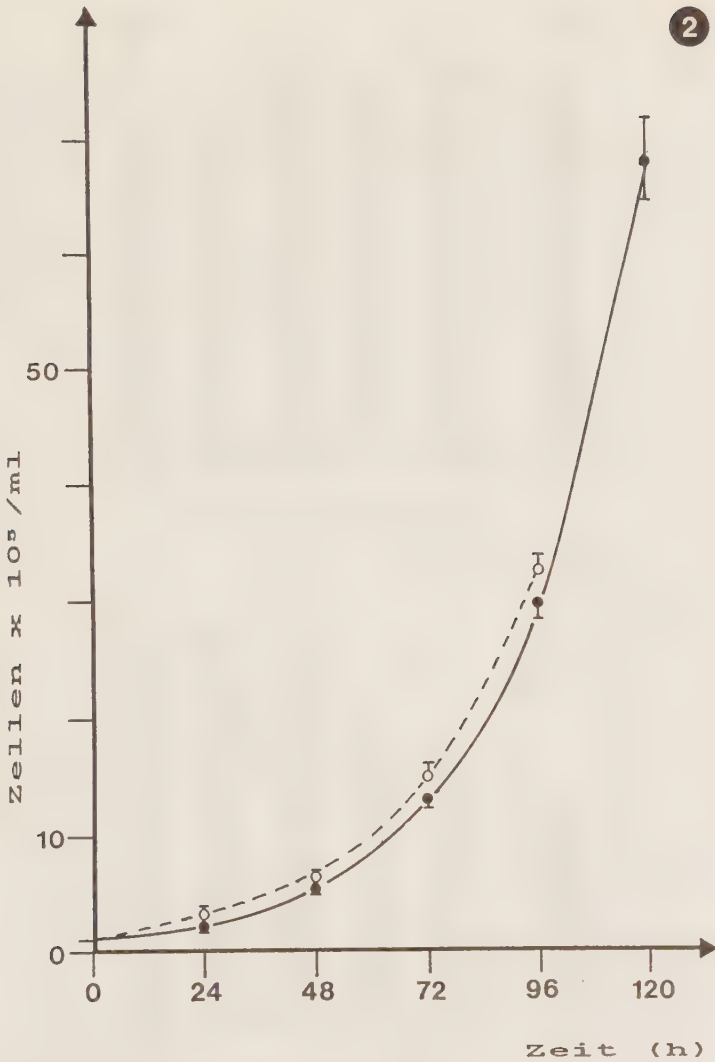


Abbildung 2: Wachstumskurve unbehandelter Lymphoblasten. Unterschiede zwischen Hämocytometer- (—) und Kulturfaschenzählung (---). Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

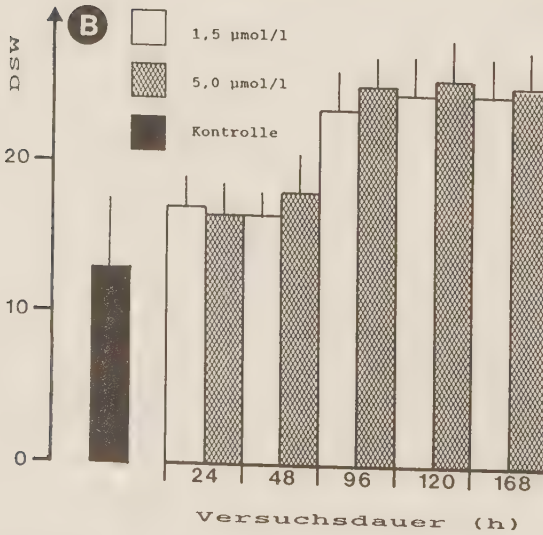
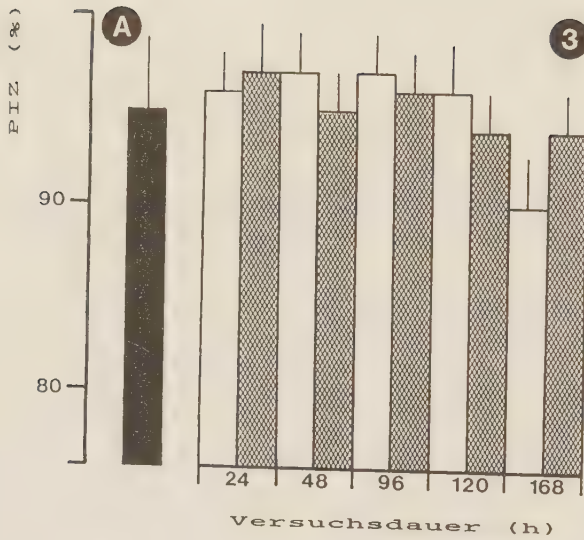


Abbildung 3: *T. annulata*-befallene Lymphozyten. Unbehandelte Kontrolle und nach Colchicin-Behandlung. A: Prozentualer Anteil infizierter Lymphozyten (PIZ). B: Durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle (DSW). Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

5 und 35. Diese Daten dienten als Vergleichswerte für die durchgeführten Versuche.

Einige der untersuchten Substanzen konnten nicht direkt dem Kulturmedium zugesetzt werden und mußten erst in DMSO gelöst werden (z.B. Taxol). Die Endkonzentration des Lösungsmittels DMSO betrug dabei maximal 1,3 $\mu\text{mol/l}$. Tabelle 2 zeigt, daß selbst hundertfach überhöhte DMSO-Konzentrationen keinen Einfluß auf die verschiedenen Kulturparameter hatten.

Tabelle 2: Kontrollen sowie der Einfluß von DMSO auf T. annulata-infizierte Lymphozyten bei 37°C. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung

Zeit (h)		infi- zierte Zellen %	Durchschnittliche Anzahl Schizonten Kerne/Zelle	Mitose- index (%)
	KONTROLLEN	95 $\pm$ 3,8	13,0 $\pm$ 4,5	5,5 $\pm$ 2,0
	D M S O			
24	13 $\mu\text{mol/l}$	95 $\pm$ 3,5	12,0 $\pm$ 2,5	4,0 $\pm$ 1,5
24	130 $\mu\text{mol/l}$	93 $\pm$ 3,0	15,2 $\pm$ 3,0	4,5 $\pm$ 1,5
96	13 $\mu\text{mol/l}$	96 $\pm$ 3,0	12,5 $\pm$ 2,5	4,0 $\pm$ 1,5
96	130 $\mu\text{mol/l}$	95 $\pm$ 2,5	14,5 $\pm$ 2,5	4,5 $\pm$ 1,5

Das ultrastrukturelle Erscheinungsbild unbehandelter T. annulata-Kulturen ist auf Abb. 5 dargestellt. Der Durchmesser der Wirtszellen stieg nach dem Theileria-Befall von etwa 7-10 μm auf durchschnittlich 25 μm an. Im Verhältnis zum Zytoplasma war der Wirtszellkern groß und bei vielen Zellen stark gelappt (s.a. Abb. 13). Das aggregierte Heterochromatin lag, zumeist peripher, dicht an der inneren Kernmembran. In den Kernen dieser transformierten Zellen kamen große Bereiche elektronenlichten Euchromatins vor. Ein oder zwei osmiophil erscheinende Nucleoli, mit einem Durchmesser von etwa 2 -2,5 μm ,

Abbildung 4: T. annulata in vitro. Giemsa gefärbte Ausstriche verschiedener Stadien.

A: Wirtslymphozyte mit Kern (NH) und jungem Schizonten (S).

B: Alterer Schizont (S) mit einzelnen Schizontenkernen (SN).

C: Teilung der Wirtszelle. Die Schizontenkerne (SN) werden durch den Spindelapparat der Lymphozytenkerne (NH) auf die Tochterzellen verteilt.

D: Merozoitenbildung in vitro. Durch Erhöhung der Versuchstemperatur auf 41 °C wurde die Bildung von Merozoiten (ME) induziert.

E: Durch Merozoiten in vitro infizierte Erythrozyten (E). Kommaförmige intraerythrozytäre Stadien (ES).

F: Längsteilung der intraerythrozytären Stadien (DS).

Maßstab für alle Teile : 10 µm.

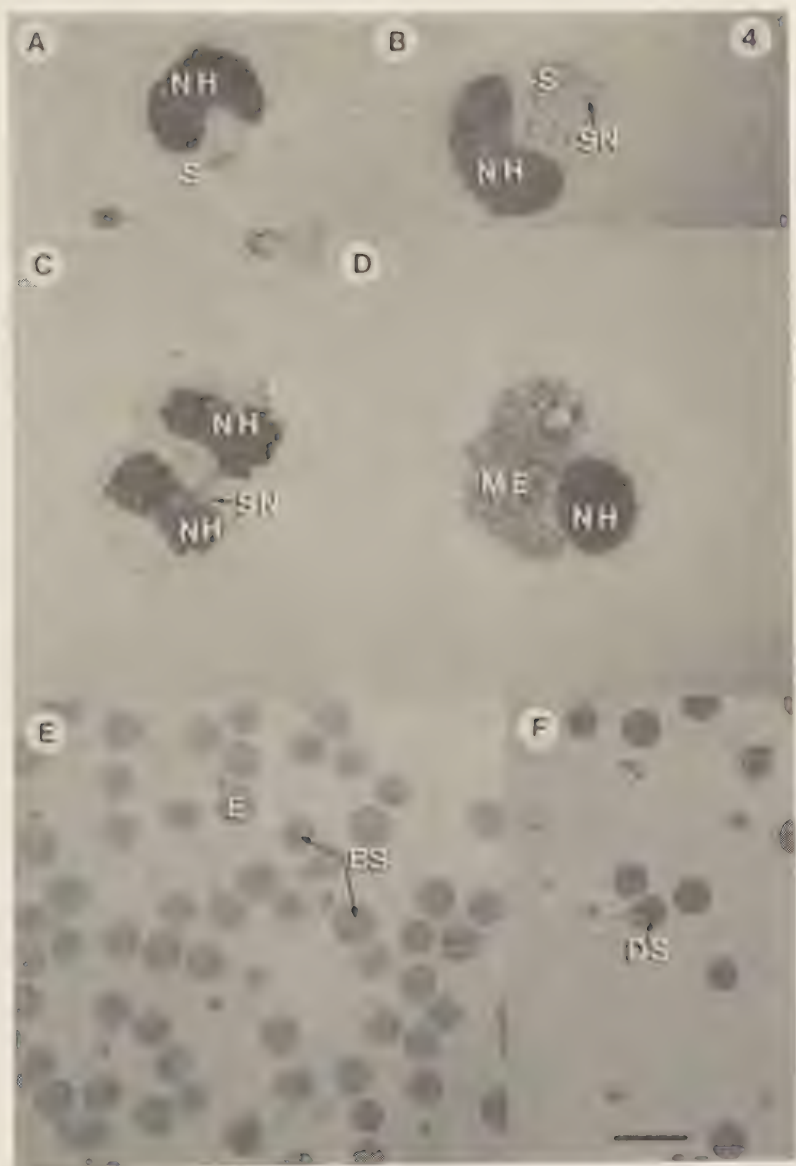


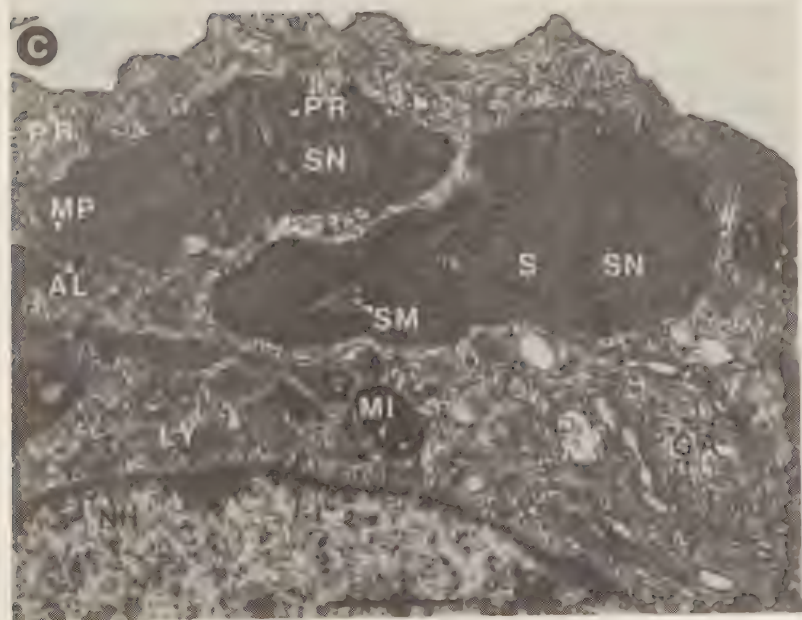
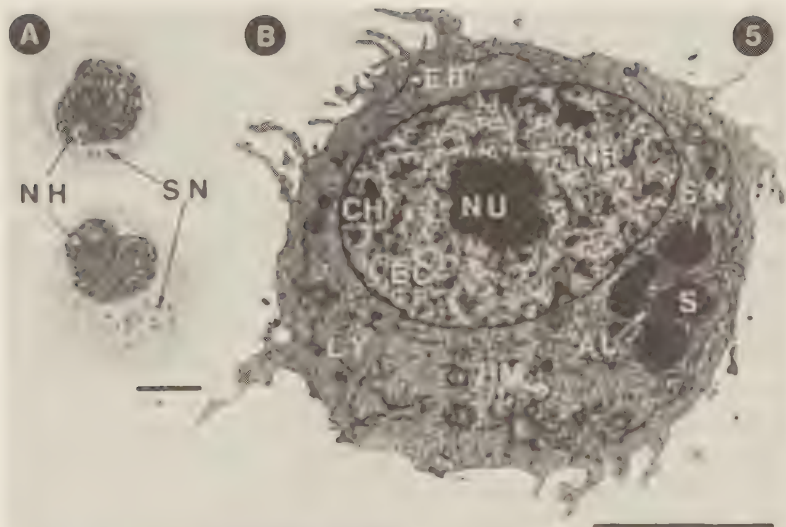
Abbildung 5: Kontrollen.

A: In vitro-infizierte Rinderlymphozyten mit T. annulata Schizonten. Oben: Junger Schizont mit wenigen Schizontenkernen. Unten: Älterer Schizont. Maßstab: 10 µm.

B: Wirtslymphozyte mit jungem Schizonten aus in vitro Haltung (37 °C). Maßstab: 5 µm.

C: T. annulata-Schizont aus Zellkultur. Maßstab: 1 µm.

AL=Annulate Lammellen; CH=Heterochromatin; EC=Euchromatin; ER=Endoplasmatisches Reticulum; GA=Golgi Apparat; HM=Mitochondrium der Wirtszelle; LY=Lymphozyte; MI=Mitochondrium; MP=Mikropore; NH=Kern der Wirtszelle; NU=Nucleolus; PR=Polyribosomen; S=Schizont; SM=Mitochondrium des Schizonten; SN=Kern des Schizonten.



traten deutlich hervor. Die Mitochondrien vom Cristae-Typ maßen $0,5 - 0,8 \mu\text{m}$ mal $1 - 1,5 \mu\text{m}$. Der Golgi-Apparat schien sehr aktiv zu sein, da Golgi-Vesikel zahlreich ausgebildet waren (Abb. 5C). Er lag meistens zwischen Wirtszellkern und Schizonten. Das rauhe Endoplasmatische Retikulum war mit wenigen einfachen Strängen im Wirtszellplasma vertreten. Zahlreiche ca. $10 - 15 \text{ nm}$ große Ribosomen und Polyribosomen (etwa $50 - 80 \text{ nm}$) traten im Wirtszellplasma auf (Abb. 5C). Einige Schizonten waren ganz oder teilweise von sogenannten Annulaten Lamellen umgeben (s. Abb. 5C, 13B und 21A). Sie erstreckten sich in der Regel zwischen Wirtszellkern und Schizont.

Im Längsschnitt erschienen sie als Aufeinanderfolge elektronendichten und aufgelockerten Materials, das zwischen einfachen Membranen in regelmäßigen Abständen angeordnet war. Bei vielen Zellen konnten diese Strukturen nicht beobachtet werden.

Die Schizonten der Theileria-Spezies können aufgrund ihrer Morphologie, auch ultrastrukturell, nicht von einander unterschieden werden (Musisi et al. 1981). Bei den hier beschriebenen T. annulata-Kulturen lagen sie, umgeben von einer einfachen Zellmembran, direkt im Plasma der Wirtszelle. Eine parasitophore Vakuole kam nicht vor. Junge Schizonten mit wenigen Kernen hatten einen Durchmesser von ca. $1 \mu\text{m}$ (Abb. 5B). Die Zahl der Kerne in älteren Schizonten variierte stark (s. Tab. 2). Davon abhängig war auch ihre Größe, die $10 - 15 \mu\text{m}$ erreichen konnte. Im Plasma des Schizonten konnten häufig doppelwandige Organellen angetroffen werden, die allgemein als acristate Mitochondrien angesehen werden. Diese Strukturen hatten häufig einen Durchmesser von $0,2 - 0,5 \mu\text{m}$ und eine Länge von $0,5 - 1,2 \mu\text{m}$. Auch Polyribosomen wurden regelmäßig im Schizontenplasma angetroffen. Mehrere Mikroporen war über die Oberfläche des Schizonten verteilt, sie besaßen einen Durchmesser von etwa $80 - 100 \text{ nm}$ und eine Tiefe von $60 - 100 \text{ nm}$ (Abb. 5C).

4.2. Kryokonservierung

Die Überlebensrate von Zellen nach einer Lagerung in flüssigem Stickstoff hängt von verschiedenen Faktoren ab: Art und Konzentration des Gefrierschutzmittels, Einfrier- und Auftau-Modus, Volumen und Material des Kryoröhrchens und dem Zelltyp.

Für bovide Lymphozyten mit Theilerien sind eine Vielzahl von verschiedenen Methoden beschrieben worden (Hulliger 1965; Cunningham et al. 1971, 1974; Hooshmand-Rad 1975; Brown 1979, 1983, 1987; Oliver et al. 1984; Wathanga et al. 1986).

Die besten Ergebnisse lieferte eine zweistufige Einfrier-methode in Anlehnung an Knight (1980) und Wathanga et al. (1986), mit 7,5 % DMSO und einer Äquilibrierungsphase bei -30 °C. Der Anteil lebender Zellen nach dem Trypanblau-Ausschluß-Test lag bei über 75 %.

Die Verwendung von Glycerin (10 %) an Stelle von DMSO ergab ähnliche Werte von bis zu 68 % lebender Zellen. Wesentlich schlechter tolerierten die Lymphozyten ein schnelles Einfrieren (Gasphase des flüssigen Stickstoffs 2 h, anschließendes Eintauchen in flüssigen Stickstoff). Trotzdem ergaben sich auch hier noch Überlebensraten von 15 % (7,5 % DMSO) bzw. 25 % (10 % Glycerin).

Die Ergebnisse zeigen, daß die zweistufige Methode und die Verwendung von 7,5 % DMSO (bzw. 10 % Glycerin) bei diesen Kulturen die besten Überlebenschancen bot. Auch nach einer Lagerung von mehr als 18 Monaten bei -196 °C lagen die Ergebnisse noch bei etwa 60 % überlebender Zellen.

4.3. Einfluß verschiedener Substanzen auf die Schizonten von *T. annulata* und deren Wirtszellen in vitro

Die folgenden Versuche wurden alle bei 37 °C durchgeführt. Als Nährmedium diente RPMI Vollmedium (s. 3.4.), das zusätzlich die zu untersuchende Substanz enthielt. Alle Versuche wurden nur an Zellkulturen mit Passage-Zahlen von 10 bis 40 durchgeführt.

Zunächst wurde versucht, die Teilung des Parasiten von der Mitose der Wirtszellen abzukoppeln. Dazu wurden verschiedene Mitose- oder Mikrotubuli-Inhibitoren getestet. Eine daraus folgende Anreicherung der Parasitenkernzahl pro Wirtszelle könnte den Auslöser für eine Merozoitenbildung darstellen.

4.3.1. Substanzen mit inhibierender Wirkung

Colchicin

Die Lymphoblasten reagierten sehr empfindlich auf Colchicin, so wurde auch bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 1 nmol/l die Mitose noch vollständig inhibiert. Ein Anstieg der Zellzahl konnte nach 24 h nicht festgestellt werden. Bei Konzentrationen über 10 µmol/l konnte eine zunehmende Lyse der Lymphozyten beobachtet werden. Der Anteil *T. annulata*-enthaltender Wirtszellen (PIZ) lag in allen Versuchen (1 nmol/l - 5 µmol/l, 0 - 240 h) im Bereich der Kontrollen (Abb. 3A, Tab. 2). Auch bestanden keine signifikanten ($p < 0,01$) Unterschiede in der durchschnittlichen Anzahl der *Theileria*-Kerne pro Wirtszelle (DSW) in den Versuchen nach 48 h. Ab 96 h Versuchsdauer konnte jedoch eine signifikante ($p < 0,01$) Vermehrung der Schizontenkerne pro Wirtszelle beobachtet werden (Abb. 3B). Dieser Anstieg trat in den Versuchen bei verschiedenen Konzentrationen auf und war zeit- und nicht konzentrationsabhängig. Längere Versuchszeiten bis 168 h erbrachten keine weitere Steigerung der Schizontenkernzahl.

Während die Mitose der Parasiten also nicht unterbunden wurde, waren die Wirtszellen in der Metaphase arretiert (s. Abb. 7A, B). Darüber hinaus setzte ab 1 $\mu\text{mol/l}$ eine zunehmende Schädigung der Wirtslymphozyten ein. Zunächst waren peripher kleine Vakuolen erkennbar, die bei Konzentrationen ab 5 $\mu\text{mol/l}$ nach 48-96 h der ganzen Zelle eine blasige Struktur verliehen (Abb. 7A). Auch diese Zellen traten noch in die Mitose ein, deren Spindelaufbau dann aber gestört war. Ultrastrukturell zeigte sich, daß die Schädigungen des Wirtszellplasmas schon nach 24 h bei 1 $\mu\text{mol/l}$ Colchicin begannen (Abb. 7B). Die Auflockerung des Plasmas war dabei über die ganze Zelle verteilt. Mitochondrien schienen nicht geschädigt zu sein.

Taxol

Taxol beeinflusst das Mikrotubuli organisierende Zentrum der Zelle und blockiert die Zellen in der G₂- oder M-Phase (s. a. 5.).

Wie schon Colchicin hatte auch Taxol keinen sichtbaren Einfluß auf den prozentualen Anteil infizierter Zellen. Die Werte lagen bei allen Konzentrations/Zeit-Kombinationen im Fehlerbereich der Kontrollen (Abb. 6A).

Die Störung des normalen Ablaufs der Mitose durch Taxol war bei den hier untersuchten Lymphozyten konzentrationsabhängig (Abb. 6C). Eine Inhibition von 5 - 7 % trat bei 0,05 $\mu\text{mol/l}$ Taxol auf, und zwar in allen Versuchen von 24 - 168 h Dauer. Ab 1 $\mu\text{mol/l}$ war die Zellteilung nach 24 h vollständig inhibiert.

Weniger stark beeinflusst schien die Teilung der Parasitenkerne. Bei Taxol-Konzentrationen von 1 und 10 $\mu\text{mol/l}$ führte das zu einer annähernden Verdoppelung der durchschnittlichen Anzahl Theileria-Kerne pro Wirtszelle nach 24 h. Die Mitose der Wirtszellen war dabei gleichzeitig vollständig inhibiert (Abb. 6B und 6C).

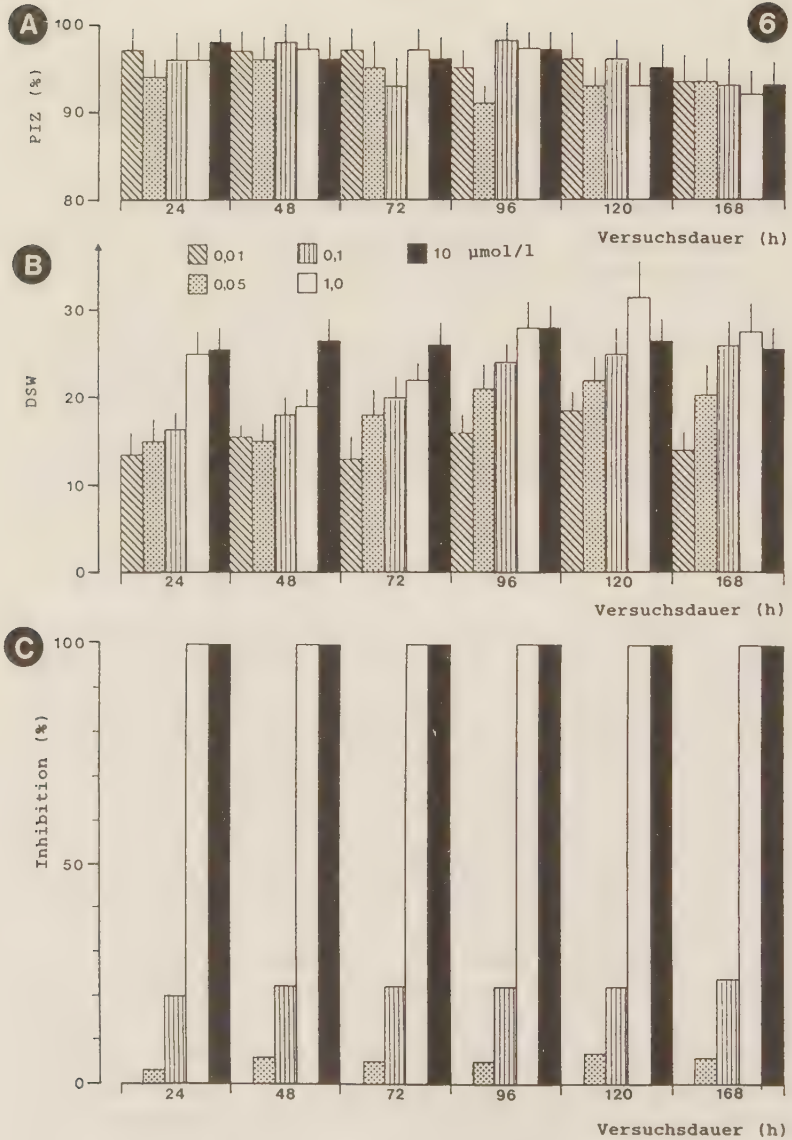


Abbildung 6: Einfluß von Taxol auf *T. annulata*-befallene Lymphozyten in Abhängigkeit von Konzentration und Versuchsdauer. A: Prozentualer Anteil infizierter Zellen (PIZ). B: Durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle (DSW). C: Inhibition der Wirtslymphozyten (%). Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

Bei längeren Versuchszeiten (bis 168 h) sind dann allerdings nur noch geringe Veränderungen der Schizontenkernzahl pro Zelle zu beobachten.

Ein signifikanter ($p < 0,01$) Anstieg der Parasitenkernzahl pro Wirtszelle bei geringeren Konzentrationen konnte nach längeren Inkubationszeiten (0,1 $\mu\text{mol/l}$ nach 48 h; 0,05 $\mu\text{mol/l}$ nach 72 h) beobachtet werden.

Keinen signifikanten Unterschied auf dem 1%-Niveau ergab sich in der Anzahl der Schizontenkerne bei Zellen, die mit 0,01 $\mu\text{mol/l}$ Taxol inkubiert wurden.

Erste Taxol-Effekte konnten nach 24 h bei 0,1 $\mu\text{mol/l}$ festgestellt werden. In so behandelten Lymphoblasten traten Mikrotubulibündel auf, deren Mikrotubulianzahl variierte (Abb. 7C). Dabei konnte keine Zeit- oder Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden. Zellen mit Mikrotubulibündeln, die aus fünf oder weniger Mikrotubuli bestanden, kamen sowohl in Langzeitversuchen mit hohen Konzentrationen (168 h, 10 $\mu\text{mol/l}$) wie auch bei niedrigeren Konzentrationen und kurzen Versuchszeiten (24 h, 0,1 $\mu\text{mol/l}$) vor. Neben diesen kamen auch in allen Versuchen ab 0,1 $\mu\text{mol/l}$ Taxol Zellen mit Mikrotubulibündeln vor, die z.T. aus über 30 Mikrotubuli bestanden. Im Querschnitt (Abb. 7D) zeigten die Bündel keinen regelmäßigen Aufbau.

Allgemein führte Taxol zu einer stärkeren Kontrastierung der Wirtszellorganellen. Das Wirtszellplasma machte einen dichteren und dunkleren Eindruck als bei unbehandelten Kontrollen. Auch die Chromatinanteile des Wirtszellkerns schienen stärker kontrastiert.

Die Schizonten selbst zeigten ultrastrukturell keine Beeinflussung durch Taxol in den verwendeten Konzentrationen. Morphologische Veränderungen, wie sie bei den Wirtszellen auftraten, wurden bei den Schizonten nicht beobachtet.

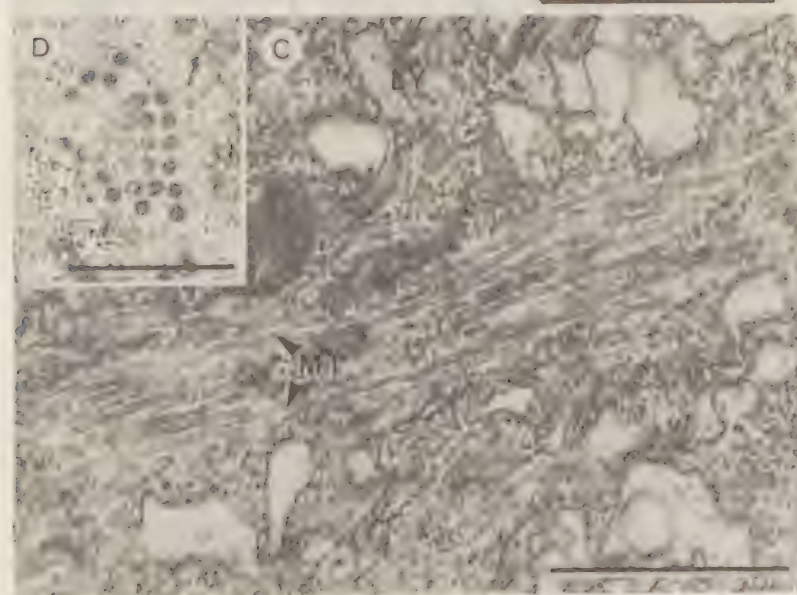
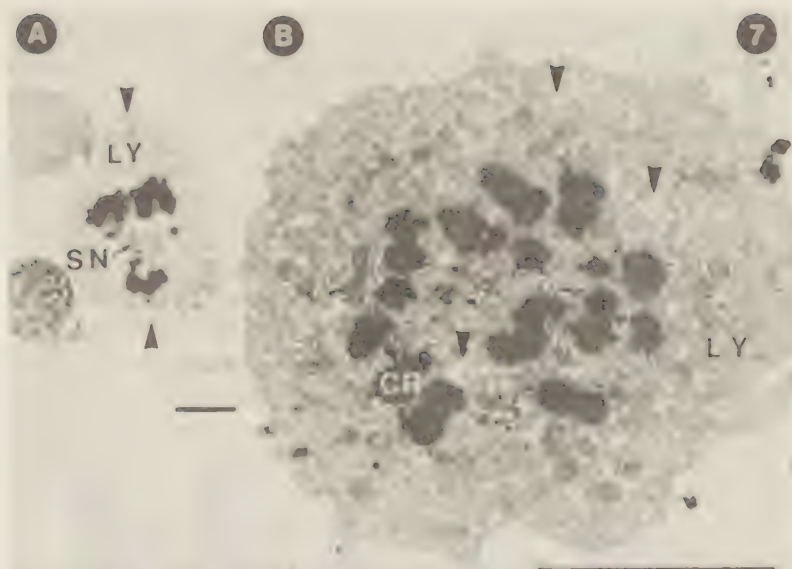
Abbildung 7: Colchicin- und Taxol-behandelte Zellen.

A: Nach Inkubation mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$ (48 h) Colchicin. Eine zweikernige Wirtszelle war in die Mitose eingetreten, aber nur ein Chromosomensatz wurde verdoppelt. Die Schizontenkerne (SN) haben sich in die Metaphasenplatte eingeordnet. Große Pfeile deuten auf Schädigungen des Wirtszellplasmas hin. Maßstab: 10 μm .

B: Wirtszelle, die nach Colchicin-Behandlung (1,5 $\mu\text{mol/l}$; 48 h) in der Metaphase arretiert war. Deutlich sind die Auflockerungen (große Pfeile) im Zellplasma zu erkennen. Maßstab: 5 μm .

C: Wirkung von Taxol (0,1 $\mu\text{mol/l}$; 24 h) auf die Wirtslymphozyten von T. annulata. Eine der häufigen Mikrotubuliensammlungen in behandelten Zellen. Maßstab: 0,5 μm .

D: Kernporen nach Taxolinkubation (0,1 $\mu\text{mol/l}$; 24 h). Maßstab: 0,5 μm . CR=Chromosomen, LY=Lymphozyte, MT=Mikrotubuli; SN=Schizontenkern.



Polyethylenglykol

Polyethylenglykol (PEG) mit einem Molekulargewicht von etwa 20.000 (Serva) wirkt stark hygroskopisch. Die Zellen müssen daher einen großen Teil ihrer Energie darauf verwenden, dem Wasserausstrom entgegenzuwirken. Dies führte in höheren Konzentrationen (7,5 % und 10 %) und bei Versuchszeiten von 96 h bis 144 h zu einer teilweisen Inhibition der Mitoserate. So war das Zellwachstum bei 7,5% PEG nach 96 h um 15 % und nach 144 h um 20 % reduziert, bei 10 % PEG betrug die Verminderung nach 96 h 20% und nach 144 h 29 %. In Konzentrationen von 5 % und 1 % konnte auch nach 144 h keine Inhibition festgestellt werden. Eine Wirkung auf den prozentualen Anteil para-

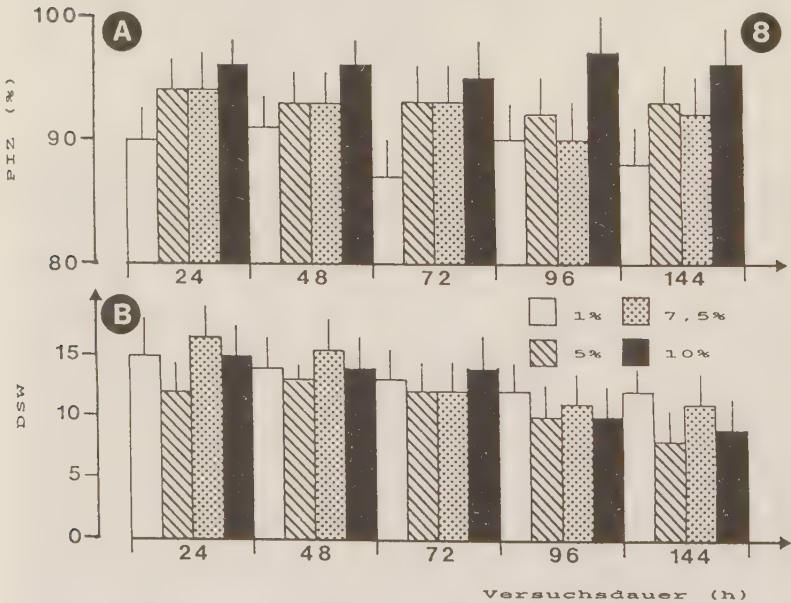


Abbildung 8: Wirkung verschiedener Konzentrationen von Polyethylenglykol (PEG) auf *T. annulata*-befallene Lymphozyten in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. A: Prozentualer Anteil infizierter Lymphozyten (PIZ). B: Durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle (DSW). Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

sitierter Wirtszellen trat nicht auf (Abb. 8A). Die Ergebnisse bewegten sich im Fehlerbereich der Kontrollen. Auch die durchschnittliche Anzahl der Schizontenkerne pro Wirtszelle (Abb. 8B) war bei 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit nicht signifikant von der der Kontrollen verschieden. Das galt auch für die Versuche, bei denen eine teilweise Verringerung der Zellvermehrungsrate auftrat.

Nach Behandlung mit PEG in Konzentrationen über 5 % trat eine Verringerung der Zellgröße auf. Zellen, die mit 5 % oder 7,5 % PEG 48 h inkubiert wurden, schrumpften auf 10 - 15 μm (vergl. 4.1.). Die Schizonten blieben dabei erhalten und schienen nicht beeinflusst zu sein. Höhere Konzentrationen (10 %) bewirkten bei verlängerten Versuchszeiten (> 48 h) Schädigungen des Wirtszellplasmas (Abb. 9A, B). Dabei waren einzelne Organellen, z.B. Mitochondrien, nicht geschädigt. Das Zytoplasma hingegen war an der Peripherie blasig aufgetrieben (Abb. 9B). Trotz dieser Schädigungen konnten die Wirtszellen noch eine Mitose durchführen (Abb. 9A). Morphologisch zeigten die Theileria-Schizonten keine Veränderungen durch eine Behandlung mit Polyethylenglykol.

Natriumazid, 2,4-Dinitrophenol und Coffein

Durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung verhindert 2,4-Dinitrophenol (Serva) die Energiespeicherung der Zelle (Lehninger 1977). In Konzentrationen von 1 und 10 mmol/l führte dies zu einer fast vollständigen Inhibition der Wirtszellen (Tab. 3). Auch die Anzahl der Schizontenkerne pro Zelle war stark beeinflusst und lag deutlich unter der der Kontrollen. Eine wesentliche Verringerung des prozentualen Anteils parasitierter Zellen konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Abbildung 9: T. annulata-enthaltende Lymphoblasten nach Inkubation mit Polyethylenglykol und Natriumazid.

A: Wirtszelle in Mitose nach 48-stündiger Behandlung mit 10 % PEG. Neben den Chromosomen (CR) sind deutlich die Schädigungen (große Pfeile) im Plasma der geschrumpften Zelle zu erkennen. Maßstab: 5 μm .

B: 96 h nach Inkubation mit 10 % PEG. Der Kern der Wirtszelle (NH) sowie die Schizonten (S) waren nicht geschädigt. Auffällig waren die peripheren blasigen Auftreibungen im Wirtszellplasma (große Pfeile). Maßstab: 1 μm .

C: Stark vakuolisierte (V) Wirtszelle nach 96-stündiger Inkubation in Natriumazid (100 mmol/l). Auch die Mitochondrien (MI) und der Kern (NH) waren von den Schädigungen betroffen. Maßstab: 5 μm .

D: Die Ausschnittvergrößerung der Kernregion von C zeigt die beginnende Auflösung (große Pfeile) der Kernhülle (NE). Maßstab: 1 μm .

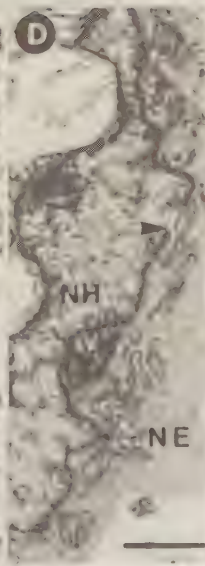
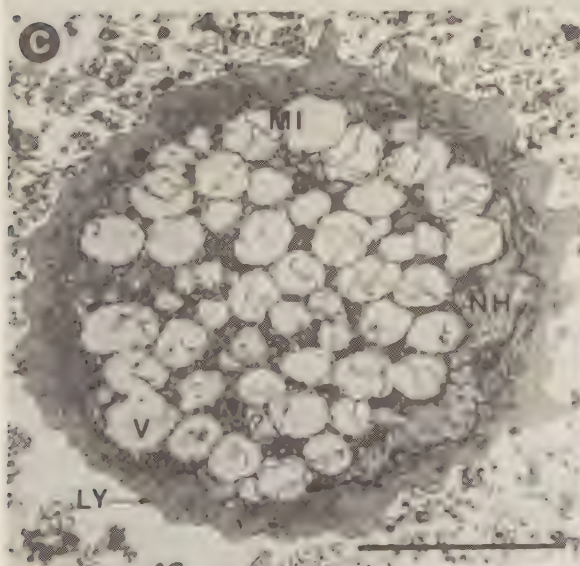
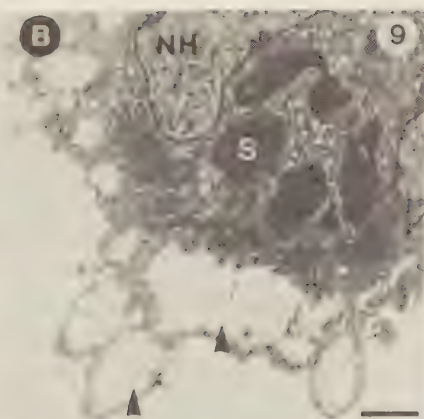


Tabelle 3: Einfluß von Natriumazid, 2,4-Dinitrophenol und Coffein auf *Theileria*-infizierte Lymphozyten bei 37°C. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen

Zeit (h)	Konzentration (mmol/l)	parasitierte Zellen %	Durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne / Zelle	Inhibition %
Natriumazid				
72	10	95 $\pm$ 2,0	12,0 $\pm$ 4,0	70
72	100	93 $\pm$ 3,0	13,0 $\pm$ 3,0	76
96	10	93 $\pm$ 1,5	13,4 $\pm$ 3,7	87
96	100	92 $\pm$ 4,0	13,0 $\pm$ 3,0	91
2,4-Dinitrophenol				
72	1	96 $\pm$ 2,0	7,0 $\pm$ 3,0	74
72	10	90 $\pm$ 2,0	8,6 $\pm$ 3,0	87
96	1	89 $\pm$ 2,0	7,6 $\pm$ 3,0	72
96	10	90 $\pm$ 2,1	7,8 $\pm$ 3,0	93
Coffein				
48	5	86 $\pm$ 3,0	17,0 $\pm$ 2,5	66
96	5	87 $\pm$ 3,0	14,0 $\pm$ 3,0	83

Natriumazid (Serva) wirkte ebenfalls stark inhibierend. Allerdings waren hierbei keine Auswirkungen auf die Anzahl der Schizontenkerne pro Wirtszelle oder die Anzahl parasitierter Zellen festzustellen (Tab. 3).

Coffein (Serva), in einer Konzentration von 5 mmol/l, hemmt die Phosphodiesterase und damit den Abbau von cyclischem 3'5'-Adenosinmonophosphat. Zusätzlich treten adenosin-antagonistische Wirkungen in vitro auf (Forth et al. 1987). Dieses führte bei den Wirtslymphozyten zu einer starken Inhibition der Zellteilungsrate (Tab. 3). Auch der prozentuale Anteil parasitierter Zellen lag deutlich unter dem der Kontrollen. Die Anzahl der Schizontenkerne pro Wirtszelle wiederum war nicht verändert. Alle drei Substanzen führten in den verwendeten Konzentrationen zu erheblichen Schädigungen der Wirtszellen. Nach 96 h Versuchsdauer waren nur noch 15 % der Zellen bei 2,4-Dinitrophenol nach Trypanblau-Test intakt. Bei Natriumazid waren es noch 20 % und bei Coffein noch 25 % der Zellen.

Ultrastrukturell zeigten alle drei Substanzen ein ähnliches Schadensbild (Abb. 9 und 10). Zuerst und überwiegend waren die Mitochondrien der Wirtszellen geschädigt. Dazu kam bei Natriumazid noch eine starke Vakuolisierung des Zytoplasmas. Bei 100 mmol/l NaN_3 war dann auch die Kernhülle geschädigt (Abb. 9C, D). Dinitrophenol hatte schon in der geringsten verwendeten Konzentration von 1 mmol/l eine massive Mitochondrienzerstörung zur Folge. Das Zellplasma blieb intakt (Abb. 10A). Bei Coffein begannen die Wirkungen mit einer Auflockerung des Wirtszytoplasmas (Abb. 10B). Nach 72 - 96 h (5 mmol/l) war die Mehrzahl der Mitochondrien zerstört. Die Schizonten zeigten zu diesem Zeitpunkt erste Anzeichen einer Auflösung.

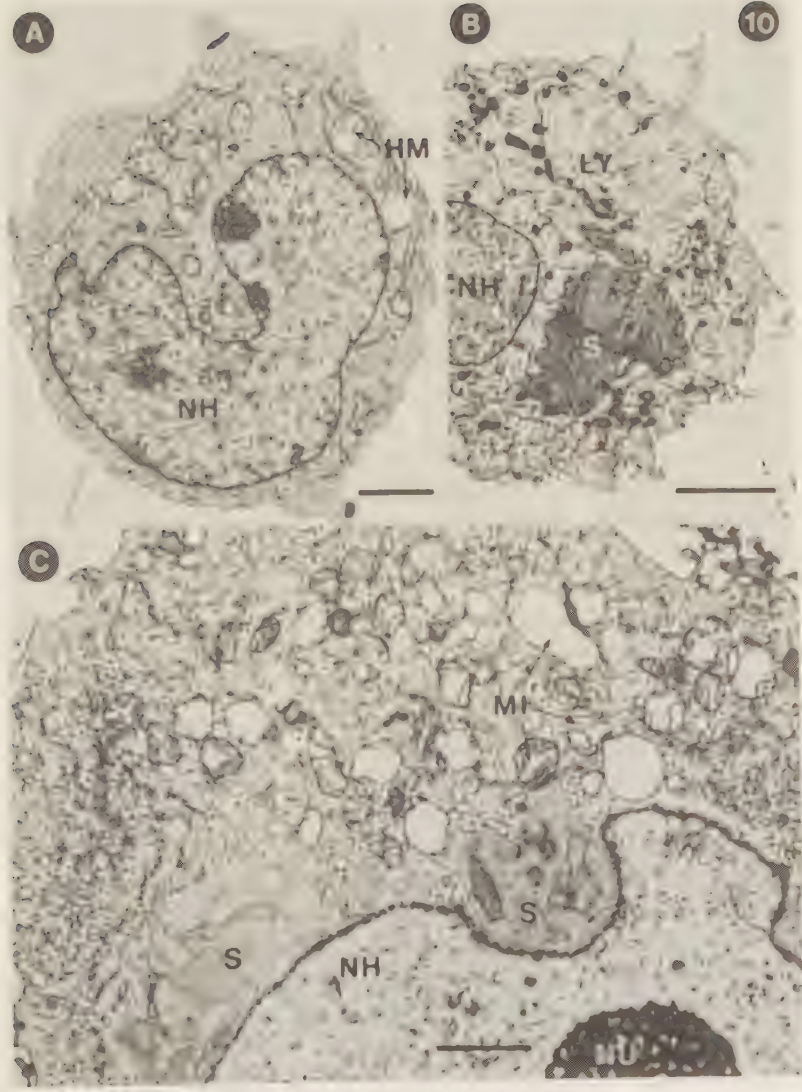
Abbildung 10: Die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol und Coffein auf T. annulata-befallene Rinderlymphozyten.

A: Massive Zerstörung der Wirtszellmitochondrien (HM) nach 72-stündiger Inkubation mit 1 mmol/l DNP. Der Kern (NH) der Wirtszelle war anscheinend nicht geschädigt.

Maßstab: 2 µm.

B: Coffein (5 mmol/l) bewirkte nach 48 h eine Auflockerung des Plasmas der Wirtszelle (LY). Der Kern (NH) sowie die Schizonten (S) waren noch intakt. Maßstab 5 µm.

C: 96 h nach Coffein-Zugabe (5 mmol/l) waren die Mitochondrien (MI) der Wirtszelle größtenteils zerstört. Auch die Schizonten (S) zeigten Zerfallerscheinungen. Kern (NH) und Nucleolus (NU) der Wirtszelle hingegen schienen noch weitgehend intakt. Maßstab: 1 µm.



Obioactin und Toxoplasma-Lysat-Antigen (TLA)

Beide Substanzen bewirken in vivo eine Stimulation des Immunsystems mit begrenzter Immunität z.B. gegen Babesia rodhaini (Ogawa et al. 1985) beziehungsweise eine Inhibition von Toxoplasma gondii in homologen und heterologen Zellkulturen (Suzuki et al. 1984a; 1984b; Osaki et al, 1984). Für T. annulata-enthaltende Rinderlymphozyten erwiesen sich beide Substanzen als zytotoxisch (Abb. 11). In einer Konzentration von 5 mg/ml verminderte Obioactin eine Zellvermehrung für 24 - 48 h. Danach setzte eine zunehmende Lyse der Lymphozyten ein. Ähnlich reagierten die Zellen auf TLA in Konzentrationen von 100 µg/ml und 200 µg/ml. Nach 144 h konnten mit Trypanblau nur noch etwa 2 % (Obioactin) bzw. 1 % (TLA) intakter Zellen nachgewiesen werden (Abb. 11).

Der prozentuale Anteil befallener Zellen änderte sich im Verlauf der Inkubation mit Obioactin oder TLA nicht wesentlich und stimmte innerhalb seiner Fehlergrenzen mit den Werten der Kontrollen überein (Abb. 12A).

Die durchschnittliche Anzahl der Schizontenkerne pro Wirtszelle war in den Versuchen mit Obioactin bei 10 mg/ml geringer als bei 5 mg/ml, signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) bestanden jedoch nicht (Abb. 12B). Als nicht signifikant erwies sich auch die scheinbare Zunahme der Schizontenkernzahl von 24 h - 144 h. Eine Abnahme der durchschnittlichen Schizontenkernzahl pro Wirtszelle von 24 h nach 144 h konnte bei TLA beobachtet werden. Aufgrund der relativ großen Streubreiten erwiesen sich diese jedoch ebenfalls als statistisch nicht signifikant. Keine Unterschiede konnten auch zwischen 100 µg/ml und 200 µg/ml festgestellt werden. Im Vergleich mit den Kontrollen lagen die Werte sowohl bei Obioactin als auch bei TLA an der unteren Grenze.

Die Feinstruktur intakter Obioactin-und TLA-behandelter Lymphozyten wies keine Besonderheiten im Vergleich zu den Kontrollen auf. Unterschiede zwischen den beiden

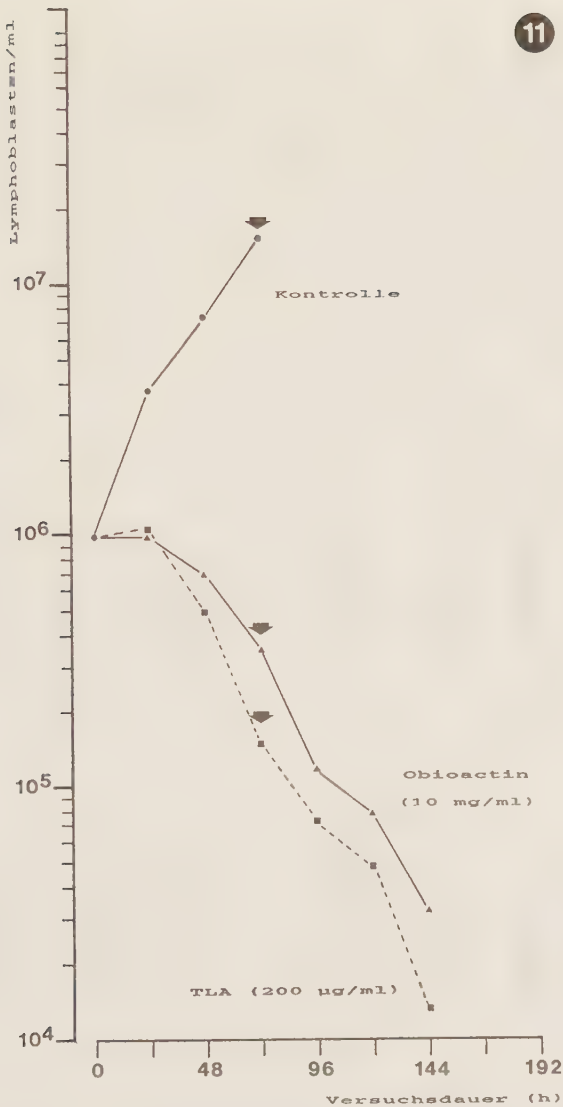


Abbildung 11: Einfluß von Obioactin (10 mg/ml; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$) und Toxoplasma-Lysat-Antigen (TLA; 200 µg/ml; $\blacksquare$ --- $\blacksquare$) auf das Wachstum *T. annulata*-befallener Lymphozyten. Zum Vergleich: unbehandelte Kontrollen ($\bullet$ — $\bullet$). Pfeile zeigen Subkultivierungen (Kontrollen) oder Medienwechsel (Obioactin und TLA) an. Mittelwerte aus mindestens 10 Versuchen.

Substanzen konnten nicht beobachtet werden. Auffällig war allerdings der sehr hohe Anteil vollkommen zerstörter Zellen nach etwa 36 - 48 h. Neben diesen Zelltrümmern traten Lymphozyten mit stark geschädigtem Zytoplasma und teilweise aufgelöster Kernhülle auf. Dieses Schadensbild entsprach weitgehend dem mit Dexamethason oder Prednisolon behandelter Lymphozyten (s. auch Abb. 16B). Die relativ wenigen intakt gebliebenen Zellen kamen überwiegend miteinander assoziiert vor. Am häufigsten waren

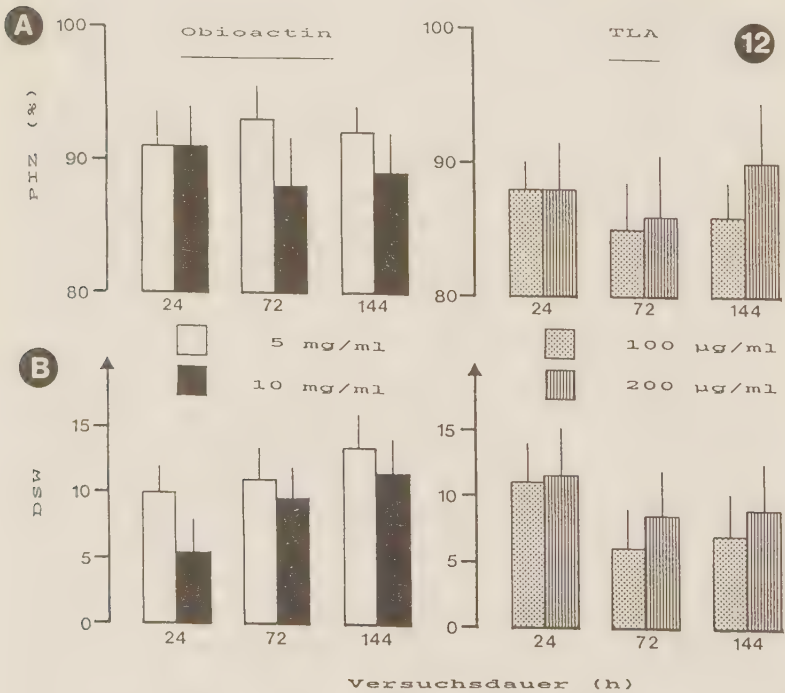


Abbildung 12: Wirkung von Obioactin und Toxoplasma-Lysat-Antigen (TLA) auf den prozentualen Anteil infizierter Zellen (PIZ) und die durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle (DSW) *T. annulata*-befallener Lymphozyten. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

Aggregate aus zwei Zellen. Aber bis zu zehn miteinander in Kontakt stehende Zellen kamen vor. Bei den Zell-Zell-Aggregaten war eine Zelle oftmals deutlich größer als die andere. Die Kontakte waren unterschiedlich stark ausgebildet (Abb. 13). Konzentrations- oder zeitabhängige Unterschiede in der Wirkung der beiden Substanzen konnten nicht festgestellt werden. Auch bei sehr engen Zell-Zell-Kontakten trat nur in ganz seltenen Fällen ($< 1\%$) eine Auflösung der Zellgrenzen auf (Abb. 14).

Die in den meisten intakten Zellen gefundenen Schizonten waren klein und enthielten nur wenige Kerne (s. Abb. 12, 13 und 14). Eine Beschädigung der Schizonten war nicht zu beobachten. Zwischen den Zelltrümmern der zerstörten Lymphozyten kamen allerdings keine intakten freien Schizonten vor.

Glucocorticosteroide

Glucocorticosteroide dienen häufig als Zusätze serumfreier Medien für verschiedene Zelllinien.

In diesen Experimenten wurde die Reaktion von T. annulata-befallenen Lymphozytenpopulationen gegenüber Glucocorticosteroiden untersucht.

Dazu wurden die wasserlöslichen Formulierungen Natrium-methylprednisolon-hemisuccinat (Urbason soluble forte, Hoechst) und Dexamethason-21-Natriumphosphat (Dexamed, Medice) verwendet. In Abbildung 15 sind die Langzeitwirkungen dargestellt. Bei Konzentrationen von 0,1 und 1 µg/ml Prednisolon und 0,5 bzw. 0,05 µg/ml Dexamethason waren schon nach 24 h deutliche Abnahmen der Zellzahl festzustellen, die sich über die ganze Versuchszeit fortsetzten. Nach 96 h waren im Falle von Prednisolon nur noch 1,5 bis 2 % der Ausgangszellpopulation vorhanden. Ähnliche Ergebnisse traten auch bei Dexamethason auf, hierbei hatte nur 1,1 bis 1,5 % der Zellpopulation überlebt (Abb. 15C).

Abbildung 13: Wirkung von Obioactin auf T. annulata-
befallene Lymphoblasten in vitro.

A-C zeigen unterschiedlich eng ausgeprägte Zell-Zell-
Aggregate. Der Grad des Kontaktes war weder zeit- noch
konzentrationsabhängig. A: 10 mg/ml; 48 h. B: 5 mg/ml;
72 h. C: 10 mg/ml; 24 h. Maßstäbe in allen Teilen 5 μ m.

Al=Annulate Lammellen; NH=Kern der Wirtszelle;

S=Schizont.

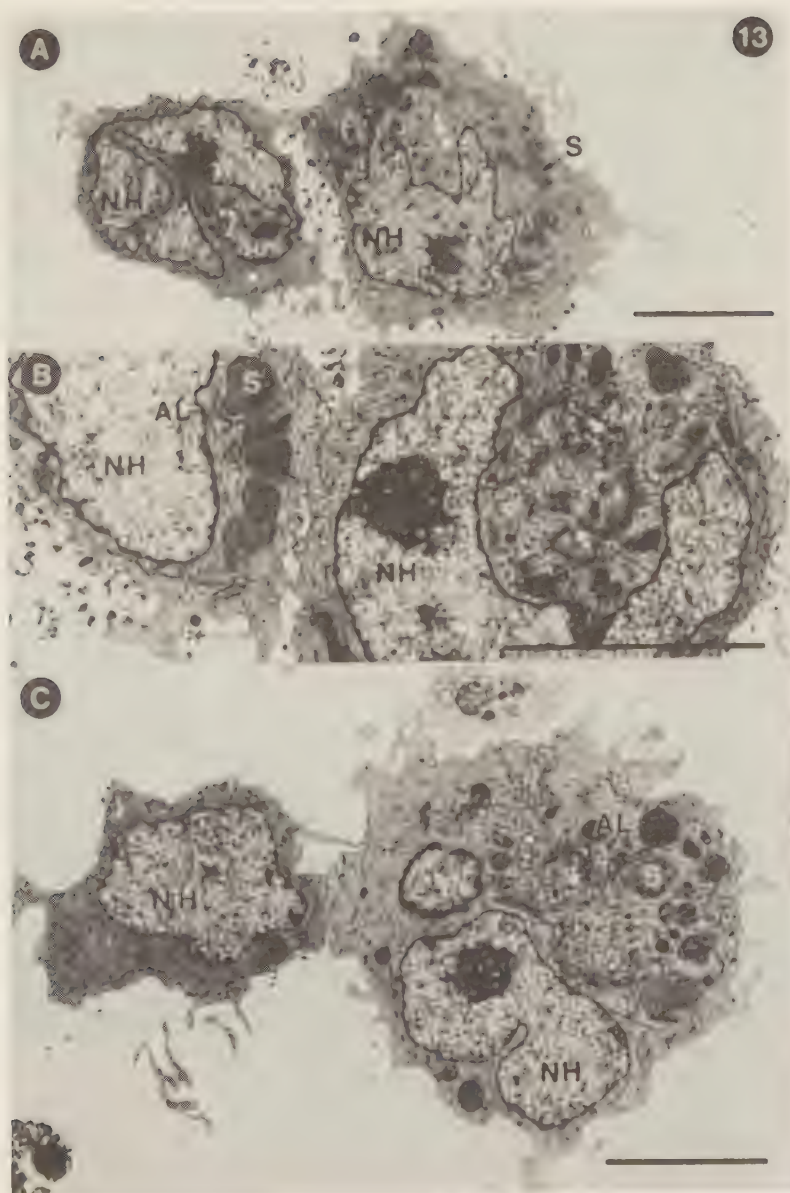


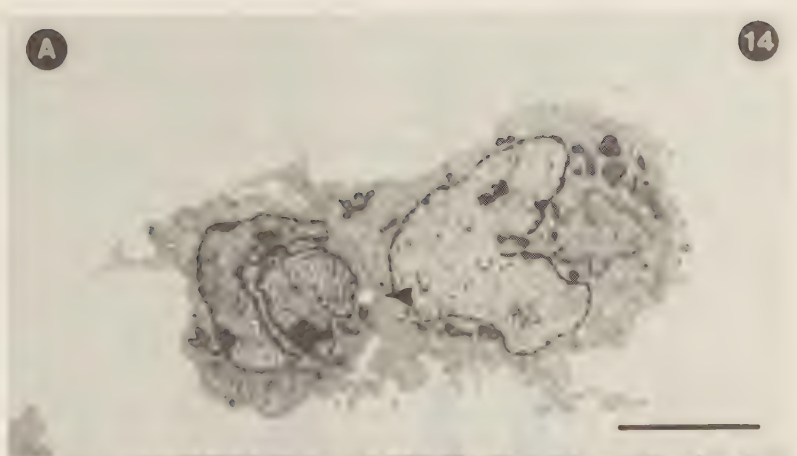
Abbildung 14: Wirkung von Toxoplasma-Lysat-Antigen auf T. annulata-befallene Lymphozyten in vitro.

A: Übersicht. Ein Zell-Zell-Aggregat mit beginnender Auflösung der Zellmembranen (große Pfeile); nach 96 h Inkubation mit TLA (200 µg/ml). Maßstab : 5 µm.

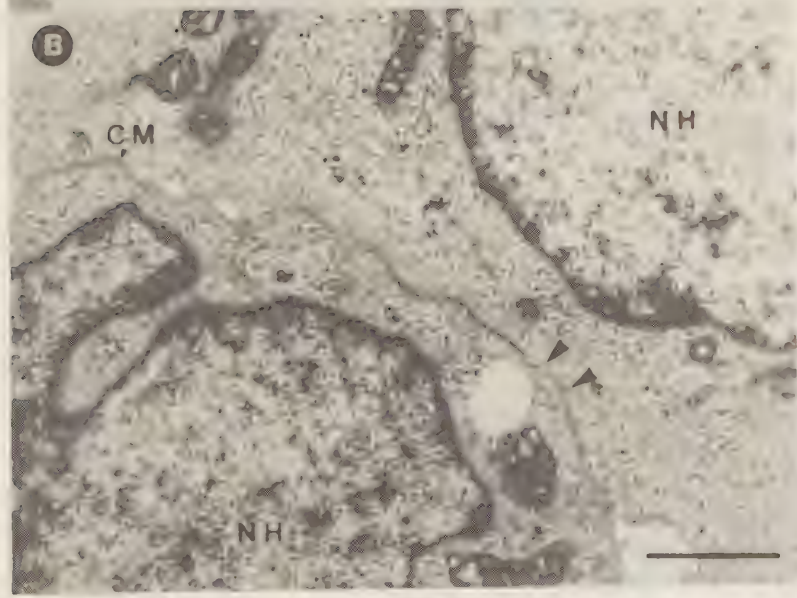
B: Ausschnittvergrößerung der Kontaktregion. Große Pfeile weisen auf die Auflösung der Zellmembranen hin.

Maßstab : 1 µm. CM=Zellmembran; NH=Kern der Wirtszelle.

A



B



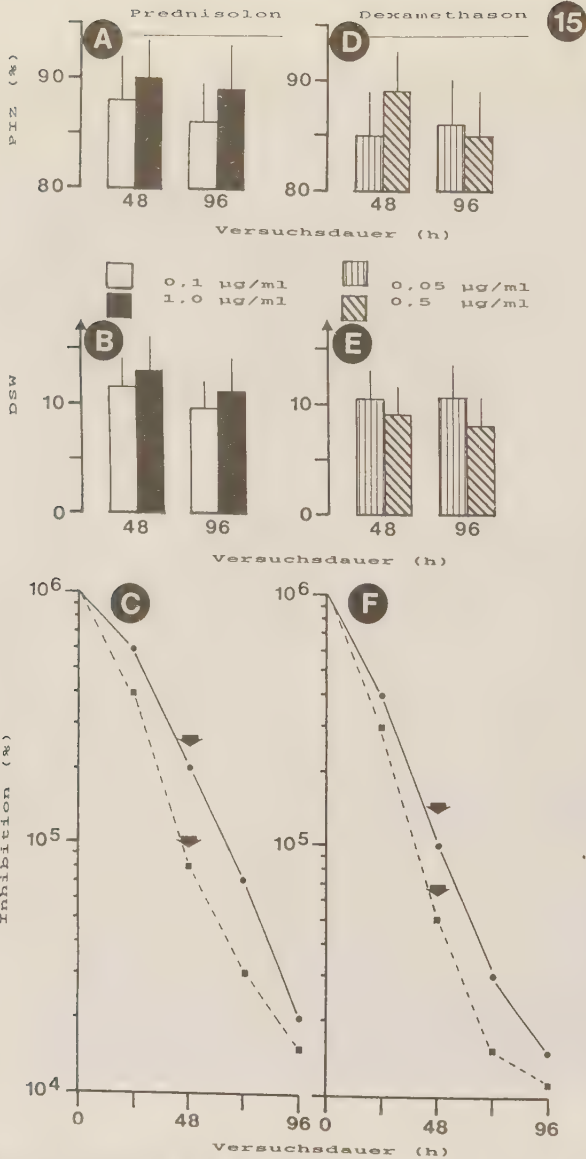


Abbildung 15: Einfluß von Glucocorticoiden auf *T. annulata*-befallene Lymphozyten. Wirkung von Prednisolon (A, B, C) und Dexamethason (D, E, F) auf den prozentualen Anteil infizierter Zellen (PIZ), die durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle (DSW) und das Wachstum der Lymphozyten. Pfeile in C und F geben den Zeitpunkt des Medienwechsels an. C: Prednisolon 0,1 µg/ml —•—; 1,0 µg/ml ----. F: Dexamethason 0,05 µg/ml —•—; 0,5 µg/ml ----. Mittelwerte ± Standardabweichung.

Beide Substanzen führten in den verwendeten Konzentrationen zu einer Verringerung des prozentualen Anteils parasitierter Zellen. Dieser war jedoch gegenüber den Kontrollen statistisch nicht signifikant (Abb. 15A). Auch die durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle (Abb. 15B) war nach 96 h leicht verringert. Der Haupteffekt bestand aber bei beiden Substanzen in einer supprimierenden Wirkung auf die Wirtszellpopulation.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten Kernanomalien bei den behandelten Zellpopulationen. Nach kurzen Versuchszeiten (bis 24 h) war durch beide Substanzen das Heterochromatin der Wirtszellen stark verklumpt (Abb. 16A). Der Grad der Schädigung stieg mit zunehmender Versuchszeit an. Dabei lagerten sich die Heterochromatinklumpen entlang der Kernhülle ab. Nach 48 h waren bei 60 - 90 % der mit Dexamethason (0,05 µg/ml) oder Prednisolon (0,1 µg/ml) behandelten Zellen die Kernhüllen teilweise aufgelöst. In dem stark aufgelockerten Zytoplasma befanden sich neben Organellresten freie Heterochromatinklumpen (Abb. 16B). Nach 96 h waren nur noch vereinzelt Zellen mit intakt erscheinendem Kern zu erkennen.

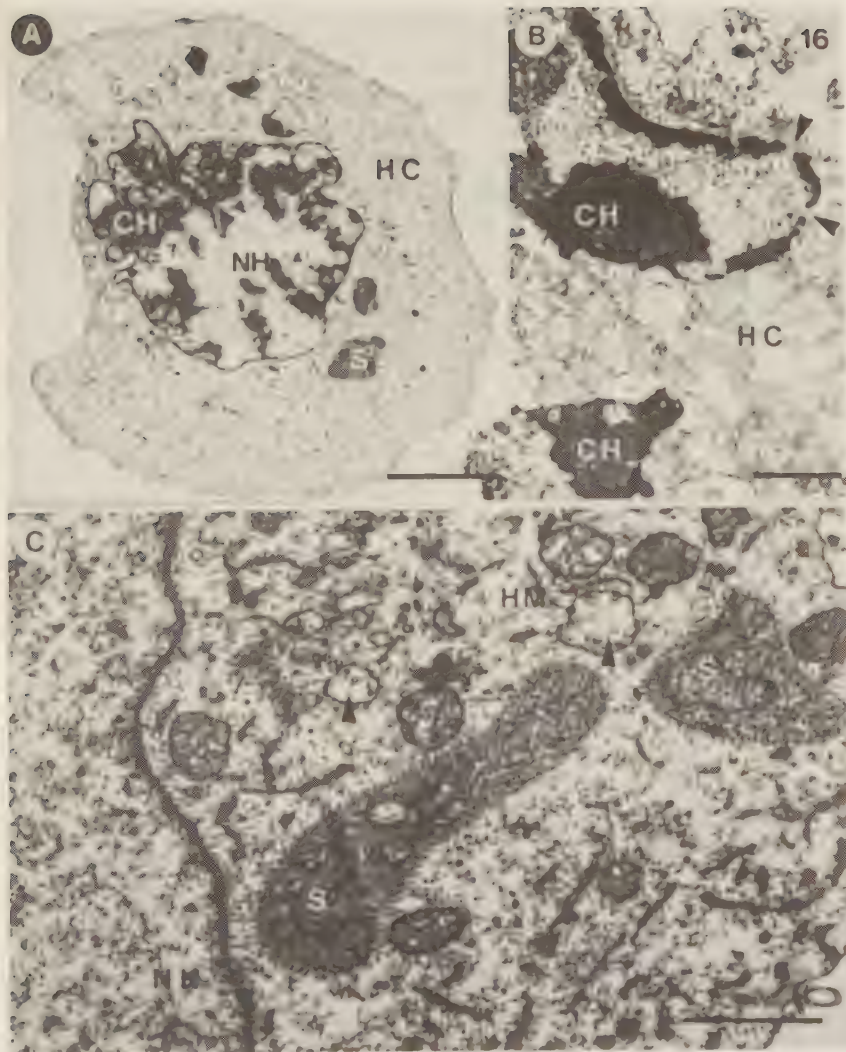
Auch bei den Schizonten traten Schädigungen auf. Nach 24-stündiger Inkubation mit Dexamethason war ein Teil der Schizonten zerstört (Abb. 16A). Nach 48 h waren in geschädigten Zellen keine Schizonten mehr erkennbar. Wie schon bei den Wirtszellen, verlief die Schädigung nach Prednisolon-Behandlung langsamer. Hier konnten nach 48 h (0,1 µg/ml) in Zellen mit beginnender Schädigung noch intakte Schizonten gefunden werden. 72 h nach Versuchsbeginn waren aber auch hier keine Schizonten mehr in den zerstörten Zellen auszumachen. Bei beiden Substanzen kamen nach 96 h (s. auch Abb. 15) noch vereinzelt anscheinend vollständig intakte Zellen mit ungeschädigten Schizonten vor.

Abbildung 16: T. annulata-enthaltende Lymphozyten nach Inkubation mit Dexamethason und Prednisolon,

A: 0,05 µg/ml Dexamethason 24 h. Das Heterochromatin (CH) im Wirtszellkern (NH) war verklumpt. Das Plasma der Wirtszelle (HC) schien ebenso aufgehellert wie die Schizonten (S). Maßstab: 1 µm.

B: 0,05 µg/ml Dexamethason 48 h. Die Kernhülle der Wirtszelle (HC) war teilweise aufgelöst (große Pfeil). Heterochromatinklumpen (CH) waren auch im Zellplasma zu finden. Maßstab: 1 µm.

C: 0,1 µg/ml Prednisolon 48 h. Die Mitochondrien (HM) der Wirtszelle waren teilweise zerstört (große Pfeil). Der Kern der Wirtszelle (NH) und die Schizonten (S) hingegen waren anscheinend noch weitgehend intakt. Maßstab: 1 µm.



4.3.2. Substanzen mit potentiell stimulierender Wirkung

Adenosintriphosphat

Als zusätzliche Energiequelle wurde dem Medium ATP in Konzentrationen von 1 mmol/l bis 100 mmol/l zugesetzt. Tabelle 4 zeigt, daß neben gutem Zellwachstum auch die Anzahl der parasitierten Zellen im oberen Bereich der Kontrollen lag. Ebenfalls deutlich über den Kontrollen befand sich die Anzahl der Schizontenkerne pro Wirtszelle. Die durchschnittliche Verdoppelungszeit der Population war mit 16,5 h gegenüber den Kontrollen (17 - 20 h) leicht verkürzt.

Tabelle 4: Die Wirkung von Adenosintriphosphat auf *T. annulata* befallene Lymphozyten bei 37 °C. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

Zeit (h)	Konzentration (mmol/l)	Parasitierte Zellen (%)	Durchschnittl. Anzahl Schizontenkerne/Zelle
48	1	98,0 $\pm$ 2,0	17,0 $\pm$ 3,0
96	1	95,0 $\pm$ 2,5	16,0 $\pm$ 3,0
48	10	96,0 $\pm$ 2,5	17,0 $\pm$ 3,0
96	10	95,0 $\pm$ 2,0	18,0 $\pm$ 3,0
48	100	96,0 $\pm$ 2,5	16,0 $\pm$ 3,0
96	100	96,0 $\pm$ 2,5	17,0 $\pm$ 3,0

Glucose

Eine weitere Verbesserung der Nährstoffsituation der Zellpopulation wurde durch die Zugabe von Glucose angestrebt. Die Ergänzung durch bis zu 100 mmol/l Glucose hatte jedoch nur geringen Einfluß auf die Zellen (Tab. 5). So waren weder die Zellvermehrung noch die durchschnittliche Anzahl der parasitierten Zellen von den Kontrollen

verschieden. Lediglich bei der Anzahl der Parasitenkerne pro Wirtszelle war gegenüber den Kontrollen eine Tendenz zu leicht erhöhten Werten festzustellen.

Tabelle 5: Die Wirkung von D-Glucose auf T. annulata-befallene Lymphozyten bei 37 °C.
Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

Zeit (h)	Konzentration (mmol/l)	Parasitierte Zellen (%)	Durchschnittl. Anzahl Schizontenkerne/Zelle
48	1	92,0 $\pm$ 3,0	15,5 $\pm$ 2,5
96	1	92,0 $\pm$ 2,5	13,5 $\pm$ 2,5
48	10	94,0 $\pm$ 3,0	16,5 $\pm$ 2,5
96	10	96,0 $\pm$ 2,5	17,5 $\pm$ 3,0
48	100	91,0 $\pm$ 2,5	14,0 $\pm$ 3,0
96	100	91,0 $\pm$ 3,5	16,5 $\pm$ 2,5

Aminosäuren

Das RPMI 1640 Grundmedium enthält, mit Ausnahme von Alanin, die 20 natürlich vorkommenden L-Aminosäuren in unterschiedlichen Konzentrationen (Moore et al. 1967). Hinzu kommt im Vollmedium noch 2 mmol/l Glutamin. Um zu überprüfen, ob die Proliferationsrate von Wirtszellen und Parasiten durch die vorhandene Aminosäurekonzentration begrenzt war, wurde das Medium mit Aminosäuregemischen der 19 im Medium vorhandenen sowie mit Alanin in folgenden Konzentrationen ergänzt:

Aminosäuremischung I (basische Aminosäuren)

Arg 200 mg/l
His 15 mg/l
Lys 40 mg/l

Aminosäuremischung II (mit geladenen polaren Resten)

Asp 20 mg/l
Glu 20 mg/l

Aminosäuremischung III
(mit nicht polaren Resten)

Ala	20	mg/l
Ile	50	mg/l
Leu	50	mg/l
Met	30	mg/l
Phe	15	mg/l
Pro	20	mg/l
Trp	10	mg/l
Val	20	mg/l

Aminosäuremischung IV (mit
ungeladenen polaren Resten)

Asn	50	mg/l
Cys	50	mg/l
Gln	290	mg/l
Gly	20	mg/l
Ser	30	mg/l
Thr	20	mg/l
Tyr	25	mg/l

Tabelle 6: Einfluß von Aminosäuremischungen auf
T.annulata-infizierte Lymphozyten bei
37 °C. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

Zeit (h)	Amino- säure- mischung	parasitierte Zellen (%)	Durchschnittliche Anzahl Schizonten kerne/ Zelle
48	I	98 $\pm$ 2,0	14,0 $\pm$ 2,0
96		95 $\pm$ 2,0	15,0 $\pm$ 2,0
144		96 $\pm$ 2,0	14,5 $\pm$ 2,5
48	II	97 $\pm$ 2,0	15,5 $\pm$ 2,0
96		98 $\pm$ 2,5	13,5 $\pm$ 1,5
144		97 $\pm$ 2,0	15,5 $\pm$ 1,5
48	III	98 $\pm$ 2,0	16,0 $\pm$ 2,5
96		95 $\pm$ 2,0	14,0 $\pm$ 2,0
144		96 $\pm$ 2,0	14,0 $\pm$ 2,0
48	IV	96 $\pm$ 2,0	11,5 $\pm$ 2,5
96		96 $\pm$ 1,5	14,5 $\pm$ 2,5
144		95 $\pm$ 1,5	16,0 $\pm$ 2,5

Die Zellen wurden 144 h in dem mit Aminosäuren ergänzten Medium gezüchtet. Die Generationszeit lag mit 17 h an der unteren Grenze der Kontrollwerte. Der Anteil parasitierter Zellen betrug zwischen 95% und 98%. Die durchschnittlichen Schizontenkernzahlen pro Zelle wiesen keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den Kontrollen auf (Tab. 6). Auch untereinander ergaben sich zwischen den vier Aminosäuremischungen keine Unterschiede. Selbst bei hohen Zellkonzentrationen von 10^7 Zellen pro ml nach 144 h schien kein Aminosäuremangel aufzutreten.

Insulin und Transferrin

Insulin und Transferrin gehören zu den Standardzusätzen serumfreier Medien und haben dort Funktionen bei der optimalen Versorgung und Regulation des Langzeitwachstums der Kulturen (Bjare 1987).

Insulin aus Rinderpankreas (Boehringer) mit einer spezifischen Aktivität >26 IU/mg wurde dem Medium, in der üblichen Konzentration von $6 \mu\text{g/ml}$, zugesetzt (Maurer 1968). Auch Transferrin aus Humanserum (Boehringer), 30% eisengesättigt, wurde dem Medium in einer Konzentration von $6 \mu\text{g/ml}$ zugesetzt (Ham 1983).

Die Ergebnisse in Tabelle 7 zeigen, daß der Zusatz beider Substanzen zu serumhaltigem Medium, in den üblichen Konzentrationen, anscheinend keine Optimierung, weder der Proliferationsrate noch der Nährstoffversorgung ermöglichen. Die Anzahl parasitierter Zellen blieb durch beide Substanzen, auch nach 96 h, unbeeinflusst. Auch der anscheinende Anstieg der durchschnittlichen Schizontenkernzahl pro Wirtszelle bewegte sich im Fehlerbereich der Kontrollen. Die untersuchten Parameter ergaben keine Verbesserung der Kulturbedingungen Theileria-haltiger Lymphozyten.

Tabelle 7: Zusatz von Insulin (6 µg/ml) oder Transferrin (6 µg/ml) zu *Theileria*-infizierten Lymphozyten bei 37 °C. Mittelwerte ± Standardabw.

Substanz	Zeit (h)	Anzahl parasitierter Zellen (%)	Durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne / Zelle
Insulin	48	95,0 ± 3,0	14,0 ± 2,0
	96	93,0 ± 3,0	16,0 ± 2,0
Transferrin	48	92,0 ± 2,0	13,5 ± 2,5
	96	93,0 ± 2,5	15,5 ± 2,5

Calmodulin

Calmodulin (aus Rinderhirn, Sigma) wurde in Konzentrationen von 2,5 µg/ml und 10 µg/ml dem Medium zugesetzt. Das Zellwachstum wurde durch diese Konzentrationen offensichtlich nicht stimuliert. Eine anscheinende Verringerung des prozentualen Anteils parasitierter Zellen war statistisch nicht signifikant. Die durchschnittliche Anzahl Parasitenkerne pro Wirtszelle lag unter dem Durchschnitt der Kontrollen, bewegte sich aber noch in deren Fehlerbereich. Ein Einfluß der Versuchsdauer war zwischen 48 h und 96 h nicht bemerkbar. Calmodulin schien, in den verwendeten Konzentrationen, keinen stimulierenden Effekt, und zwar weder auf die Wirtszellen noch auf die Parasiten, zu haben.

Tabelle 8: Ergänzung des Mediums mit Calmodulin bei 37 °C. Mittelwerte ± Standardabweichung

Zeit (h)	Konzentration (µg/ml)	Anzahl parasitierter Zellen (%)	Durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne / Zelle
48	2,5	91,0 ± 3,0	11,5 ± 2,5
96	2,5	91,0 ± 2,5	13,5 ± 2,5
48	10,0	89,0 ± 2,0	10,0 ± 2,0
96	10,0	92,0 ± 2,5	12,5 ± 2,5

DNA, RNA und t-RNA

Da bei der Merozoitenbildung eine hohe Nucleinsäure- und Proteinsyntheserate zu erwarten ist, wurde untersucht, ob die Synthese- und Proliferationsrate der Kulturen durch die Zugabe von DNA (aus Kalbsthymus, Boehringer), RNA (aus Hefe, Boehringer) und t-RNA (aus Kalbsleber, Boehringer) gesteigert werden kann.

Der Anteil infizierter Zellen entsprach bei allen Versuchen dem der Kontrollen (Abb. 17A). Allerdings konnte nach Zugabe von DNA eine Tendenz zu erhöhten Werten festgestellt werden. t-RNA hingegen schien den Anteil parasitierter Zellen geringfügig zu erniedrigen (Abb. 17A). Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) ergab sich bei der durchschnittlichen Anzahl Schizontenkerne pro Zelle durch den Zusatz von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ und 5 $\mu\text{g/ml}$ DNA. Auch RNA erbrachte einen leichten Anstieg der Schizontenkernzahl pro Zelle (Abb. 17B). t-RNA hingegen ergab im Vergleich mit den Kontrollen keinen Anstieg. Es zeigte sich, daß die Teilungsrate der Kultur durch die Nucleinsäure-Zusätze nicht beeinflusst wurde, die Generationszeit lag mit 17,5 h innerhalb der Streubreiten der Kontrollkulturen.

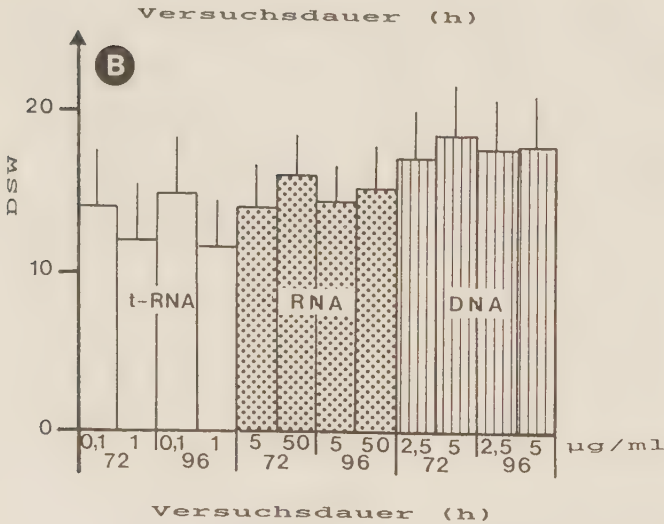
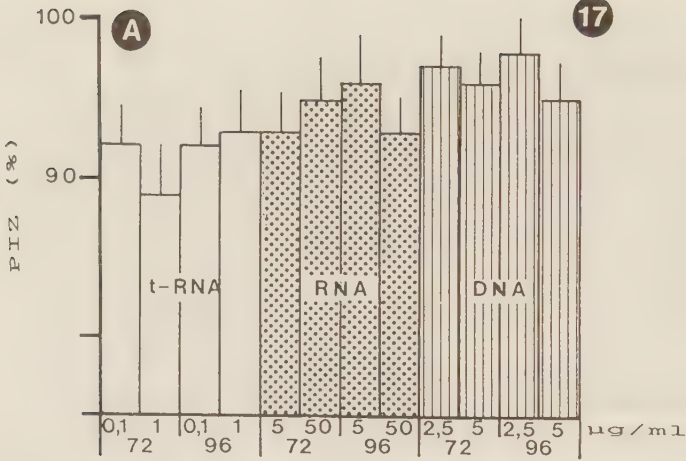


Abbildung 17: Einfluß von Nucleinsäuren auf den prozentualen Anteil infizierter Zellen (PIZ) und die durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle (DSW). Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

4.4. Temperaturabhängige Induktion der Merozoitenbildung bei *T. annulata* in vitro

Im Verlauf der Krankheit treten erhöhte Körpertemperaturen bei den befallenen Tieren auf. Ob diese erhöhte Temperatur eine Wirkung auf die Entwicklung der Krankheitserreger hat, wurde in vitro untersucht.

Wie in Abschnitt 3.4. und 3.8. beschrieben, wurden die Zellen bei 41 °C in einer 5 % Kohlendioxid-Atmosphäre bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Das Medium wurde täglich erneuert. Auch bei den Kontrollen, bei 37 °C, erfolgte ein täglicher Medienwechsel.

Lichtmikroskopische Ergebnisse

Tabelle 9 zeigt, daß der prozentuale Anteil der parasitierten Zellen und der Mitoseindex jeweils in den Fehlerbereichen der Kontrollen lag (vergl. Tab.2); lediglich nach 12 Tagen bei erhöhter Temperatur war eine leichte Abnahme bei beiden Parametern festzustellen.

Tabelle 9: Prozentualer Anteil parasitierter Zellen und Mitoseindex von *T. annulata*-befallenen Lymphozyten in vitro bei 41 °C Versuchstemperatur. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

Zeit (Tage)	Anteil parasi- tierter Zellen %	Mitose- index %
1	97 $\pm$ 2,5	5,3 $\pm$ 1,3
2	95 $\pm$ 2,5	4,7 $\pm$ 1,8
3	93 $\pm$ 3,6	2,8 $\pm$ 1,7
4	98 $\pm$ 2,5	4,4 $\pm$ 1,5
5	95 $\pm$ 2,0	4,4 $\pm$ 1,6
6	95 $\pm$ 2,2	4,6 $\pm$ 1,1
7	97 $\pm$ 2,5	5,8 $\pm$ 1,8
8	96 $\pm$ 2,0	4,2 $\pm$ 1,5
9	93 $\pm$ 2,0	3,5 $\pm$ 1,5
10	95 $\pm$ 2,5	3,2 $\pm$ 1,1
11	91 $\pm$ 2,5	2,8 $\pm$ 2,2
12	89 $\pm$ 2,3	2,8 $\pm$ 2,2
15	88 $\pm$ 2,5	2,8 $\pm$ 1,6

Deutlich von der Kontrolle verschieden war die durchschnittliche Anzahl der Parasitenkerne pro Wirtszelle (Abb. 18). Ab dem dritten Versuchstag ergaben sich hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$). Trotz der großen Fehlerbereiche war eine zeitliche Abhängigkeit mit stetiger Zunahme der Anzahl Parasitenkerne pro Wirtszelle festzustellen. Die Spitzenwerte wurden regelmäßig zwischen Tag 7 und Tag 11 erreicht. Ab dem neunten Tag sanken die Werte wieder ab und erreichten am zwölften Tag ein Plateau, das bis Tag 15 immer noch deutlich über der Kontrolle lag.

Während nach den vorherigen Versuchen (4.3.1. und 4.3.2.) in den Ausstrichen keine Schizonten gefunden werden konnten, die sich in der Phase der Merozoitenbildung befanden (s. auch 2.2. und Abb. 1), traten ab dem vierten Versuchstag erstmals solche Stadien in den Ausstrichen auf (Abb. 4D, 19 und 21C).

Der Anteil der Zellen mit merozoitenbildenden Parasiten stieg am sechsten Tag auf 3,6 % an und erreichte am achten Tag mit 4 % den höchsten Wert. Von Tag 9 an nahmen die Werte leicht ab, mit einem deutlichen Einbruch am elften Versuchstag, und pendelten sich zwischen Tag 12 und 15 wieder auf etwa 3 % ein.

Abbildung 20 zeigt, daß die Anzahl der Parasitenkerne und der prozentuale Anteil merozoitenbildender Schizonten sich mit zunehmendem Alter der Kulturen verringerte (vergl. 4.1.). Die durchschnittliche Anzahl der Parasitenkerne pro Wirtszelle blieb, nach sieben Tagen bei 41 °C, bis etwa zur 40. Subkultur, annähernd konstant. Ab Passage-Nummer 50 lagen die Werte deutlich unter denen jüngerer Kulturen (Passage-Nummer 5-30) und fielen bis Passage-Nummer 100 noch leicht ab.

Auch der prozentuale Anteil merozoitenbildender Schizonten erreichte bei jüngeren Kulturen, nach sieben Tagen bei 41 °C, deutlich höhere Werte. Hier begann die Abnahme der Werte schon ab Passage-Nummer 30 und sank bis Passage-

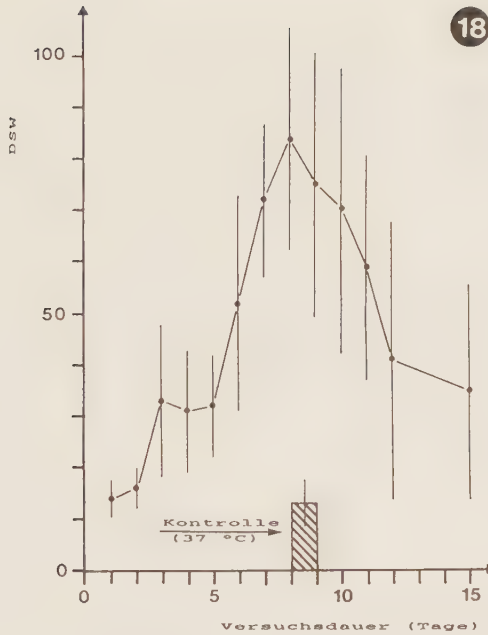


Abbildung 18: Einfluß einer Versuchstemperatur von 41 °C auf die durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne (DSW) *T. annulata*-befallener Lymphozyten in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Zum Vergleich: Kontrollwerte bei 37 °C. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

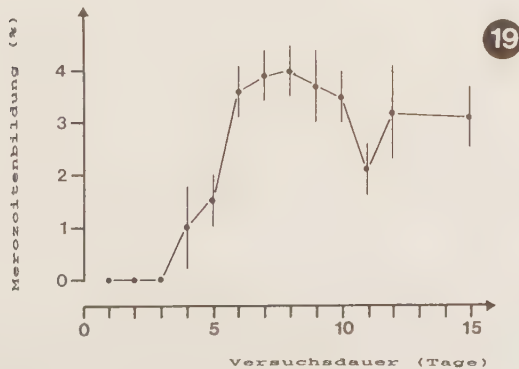


Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der Merozoitenbildung von *T. annulata* bei 41 °C in vitro. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

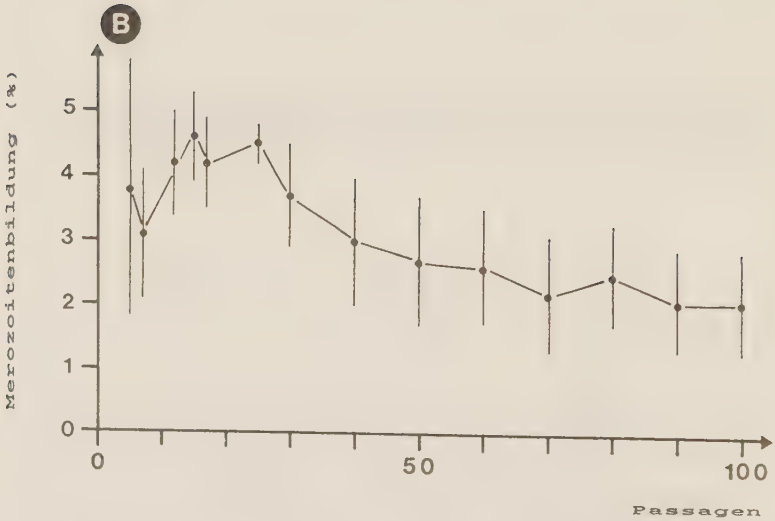
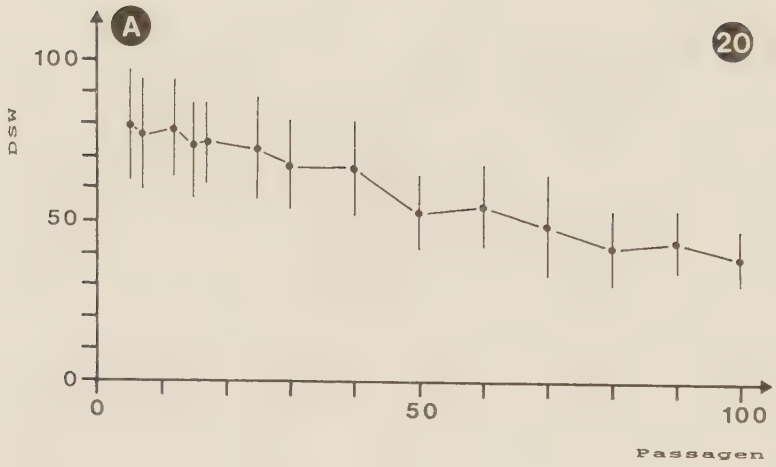


Abbildung 20: Merozoitenbildung in vitro nach 7 Tagen bei 41 °C Versuchstemperatur in Abhängigkeit vom Alter der Kultur. A: Durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle (DSW). B: Prozentualer Anteil merozoitenbildender Zellen. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

Nummer 70 auf etwas mehr als die Hälfte der Maximalwerte ab und blieb dann bis Passage-Nummer 100 annähernd konstant.

Nach einer mehrwöchigen Lagerung (4 - 50 Wochen) in flüssigem Stickstoff (vergl. 3.7. und 4.2.) wurden die Zellen 72 h bei 37 °C gehalten. So behandelte Zellen zeigten in Versuchen, nach sieben Tagen bei 41 °C, keine wesentliche Beeinträchtigung der Merozoitenbildung (Abb. 22). Zwar lagen sowohl die durchschnittliche Anzahl der befallenen Zellen als auch der prozentuale Anteil merozoitenbildender Schizonten unter den Mittelwerten nicht tiefgefrorener Kulturen (vergl. Abb. 20), bewegten sich aber dennoch deutlich innerhalb deren Streubreiten.

Eine Ausnahme bildeten lediglich kryokonservierte Kulturen mit Passage-Nummern über 70. Hierbei konnten in Ausstrichen keine Schizonten mehr gefunden werden, die sich in der Phase der Merozoitenbildung befanden.

Für die weiteren Versuche bei 41 °C, insbesondere für die in 4.6. beschriebenen, wurden nur Kulturen verwendet, zumeist kryokonserviert, deren Passage Nummern zwischen 5 und 35 lagen. In diesem Bereich (s.o.) ergab sich die beste Vergleichbarkeit sowohl zwischen Kulturen verschiedenen Alters als auch zwischen kryokonservierten und nicht tiefgefrorenen Zellen.

Elektronenmikroskopische Untersuchung

Zur genaueren Untersuchung der Merozoitenbildung wurden Ultradünnschnitte des Kulturmaterials elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei konnten beide in vivo bei Theileria vorkommenden Typen der Merozoitenbildung (Schein et al. 1978) auch in vitro beobachtet werden. Bei Typ I werden an der Peripherie eines Schizonten gleichzeitig Merozoiten abgeschnürt. Der Schizont bekommt ein rosettenförmiges Aussehen (Abb. 21).

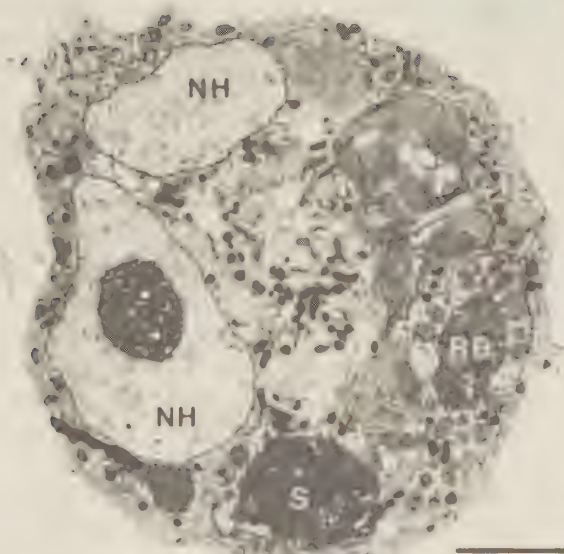
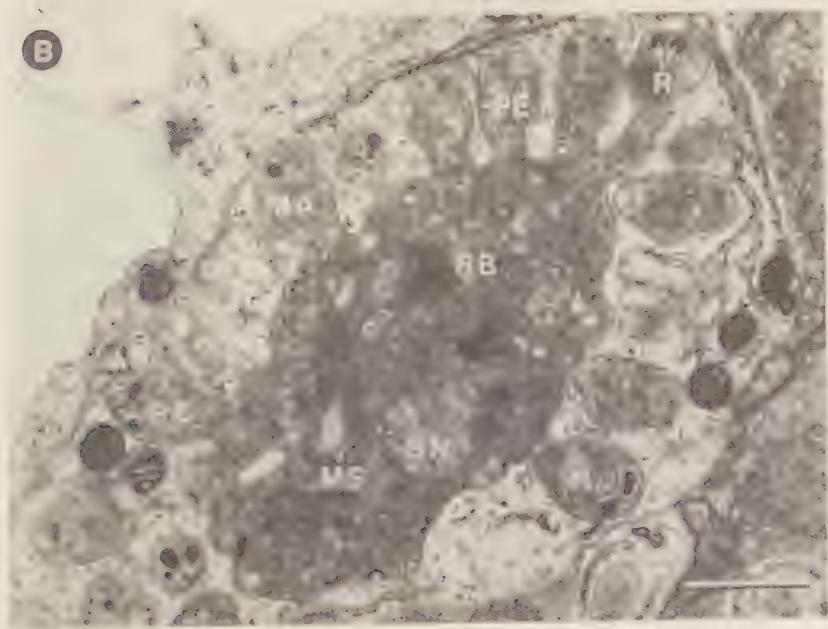
Typ II besteht in einem kontinuierlichen Zerfall eines Schizonten, von dessen einzelnen Kernen sich mehrere Mero-

Abbildung 21: Merozoitenbildung bei T. annulata in vitro I.
Wirtszelle mit Schizonten nach 7 Tagen bei 41 °C.

A: Übersicht. Kleine Wirtszelle mit zwei Kernanschnitten (NH) und mehreren kleinen Schizonten (S).

Von einem der Schizonten (RB) schnüren sich Merozoitenanlagen rosettenförmig ab (Typ I). Maßstab : 5 µm.

B: Ausschnitt. In den Merozoitenanlagen (MA) sind neben Kernen (N) und Rhoptrien (R) auch bereits Teile der Pellikula (PE) zu erkennen. Die Abschnürungen erfolgen von einem Restkörper (RB) der noch wenige Kerne (SN) sowie ein Mitochondrium (MS) enthält. Maßstab: 1 µm.

A**21****B**

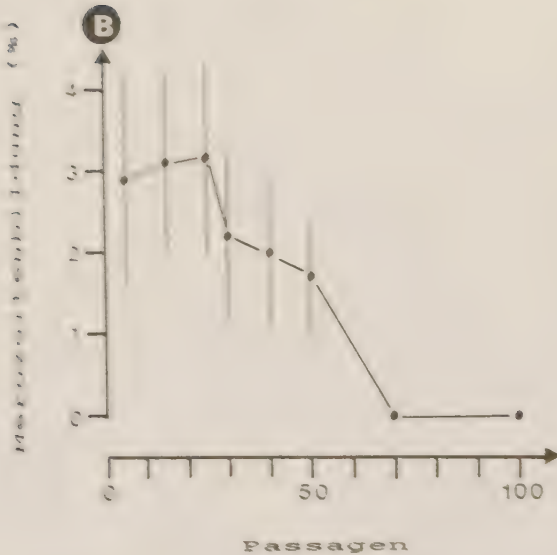
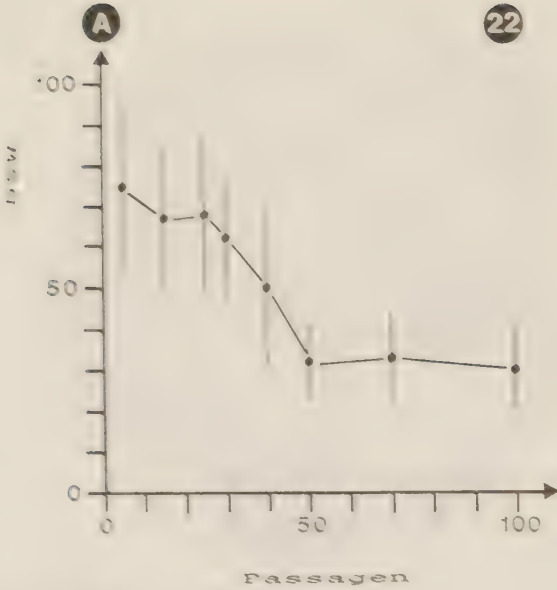


Abbildung 22. Einfluß der Kryokonservierung.
 A: Durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle (WSK). B: Meroplasmenbildung in Abhängigkeit vom Alter der Kultur. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

zoitenanlagen abschnüren (Abb. 23).

Bei 1000 merozoitenbildenden Zellen aus 20 verschiedenen Kulturen wurden in 18,5 % der Zellen Rosetten gefunden. 81,5 % der Zellen bildeten die Merozoiten wie bei Typ II beschrieben. Typ I-Rosetten traten dabei häufig in kleinen Zellen auf, die 15 μm im Durchmesser nicht überschritten. Meist enthielten diese Zellen mehrere kleine Schizonten beziehungsweise Schizontenanschnitte (Abb. 21A). Die Merozoitenanlagen besaßen neben einem Kern häufig 1-2 Rhoptrien und teilweise Strukturen der Pellikula und des Polringsystems (Abb. 21B). Die Abschnürungen erfolgten von einem sogenannten Restkörper, der außer wenigen großen Kernen auch Mitochondrien enthielt (Abb. 21B).

Typ II der Merozoitenbildung war in Zellen vertreten, die 20 - 30 μm Durchmesser besaßen. Von einem oder mehreren großen und vielkernigen Schizonten schnürten sich dabei sukzessive immer kleinere Abschnitte ab. Darin entwickelten sich an den Rändern Rhoptrien und Teile der Pellikula. Kleine, meist nur ein bis zwei Kerne enthaltende Abschnitte zerfielen in mehrere Merozoiten. Die Schizonten schienen sich dabei nach und nach zu verbrauchen. In späten Stadien war die ganze Zelle mit vollentwickelten Merozoiten angefüllt (Abb. 21C und D).

Die Merozoiten, die aus beiden Typen hervorgingen, besaßen die gleiche Feinstruktur. Sie waren oval bis birnenförmig und etwa 1 μm lang. Ihr Durchmesser betrug ca. 0,5 μm . Der basal liegende Kern nahm etwa die Hälfte des Merozoiten ein. Am apikalen Pol waren 3 Rhoptrien von etwa 0,1 bis 0,2 μm Durchmesser erkennbar. Der ganze Merozoit war von einer Zellmembran umgeben, die an verschiedenen Stellen von zwei inneren, dicht beieinander liegenden Membranen unterlegt war (Abb. 23D). Am apikalen Pol bildeten diese inneren Membranen ein Polringsystem. Außerdem enthielten die Merozoiten ein Mitochondrium. In keinem Fall konnten Mikroporen bei den Stadien gefunden werden, obwohl diese Strukturen sowohl bei den Schizonten (Abb. 5C), wie auch bei den intraerythrozytären Stadien

Abbildung 23: Merozoitenbildung bei T. annulata in vitro II. Wirtszelle mit Schizonten nach 11 Tagen (A, B, C) bzw. 13 Tagen (D) bei 41 °C.

A: Übersicht. Große Wirtszelle mit einem oder mehreren stark zergliederten Schizonten (S). Maßstab: 5 µm.

B: Ausschnitt aus A. Merozoitenanlage (MA) mit Rhoptrien (R) und Pellikulateilen (PE). Maßstab: 2 µm.

C: Große Merozoitenanlage (MA), an deren Peripherie sich mehrere Pellikulateile (PE) und Rhoptrien (R) angeordnet haben. Maßstab 2 µm.

D: Reifer Merozoit mit Kern (MN), Rhoptrien (R) und Polringsystem (P). Maßstab 0,2 µm.

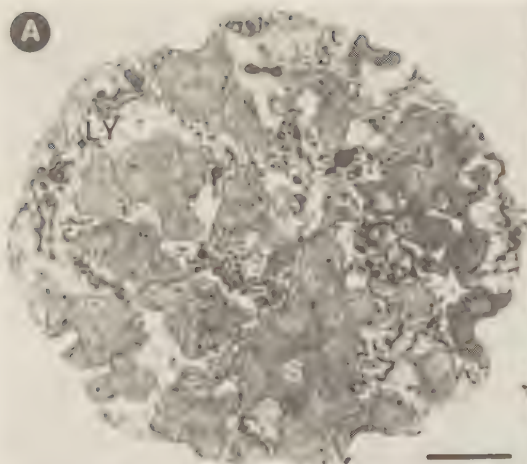
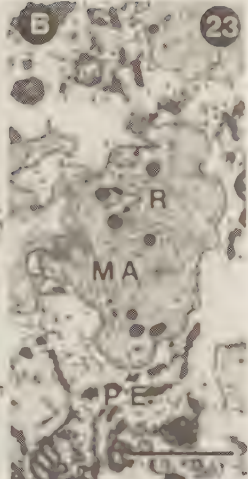
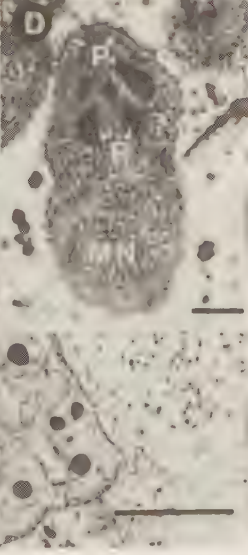
(A)**(B)****(23)****(C)****(D)**

Abbildung 24: Merozoitenbildung bei T. annulata in vitro III.
Gegen Ende der Merozoitenbildung ist die ganze Wirtszelle mit
reifen Merozoiten (ME) angefüllt.

A: 12 Tage bei 41 °C. Maßstab: 10 µm.

B: 10 Tage bei 41 °C. Maßstab: 2 µm.

MA=Merozoitenanlage; ME=Merozoit; NH=Kern der Wirtszelle.

A

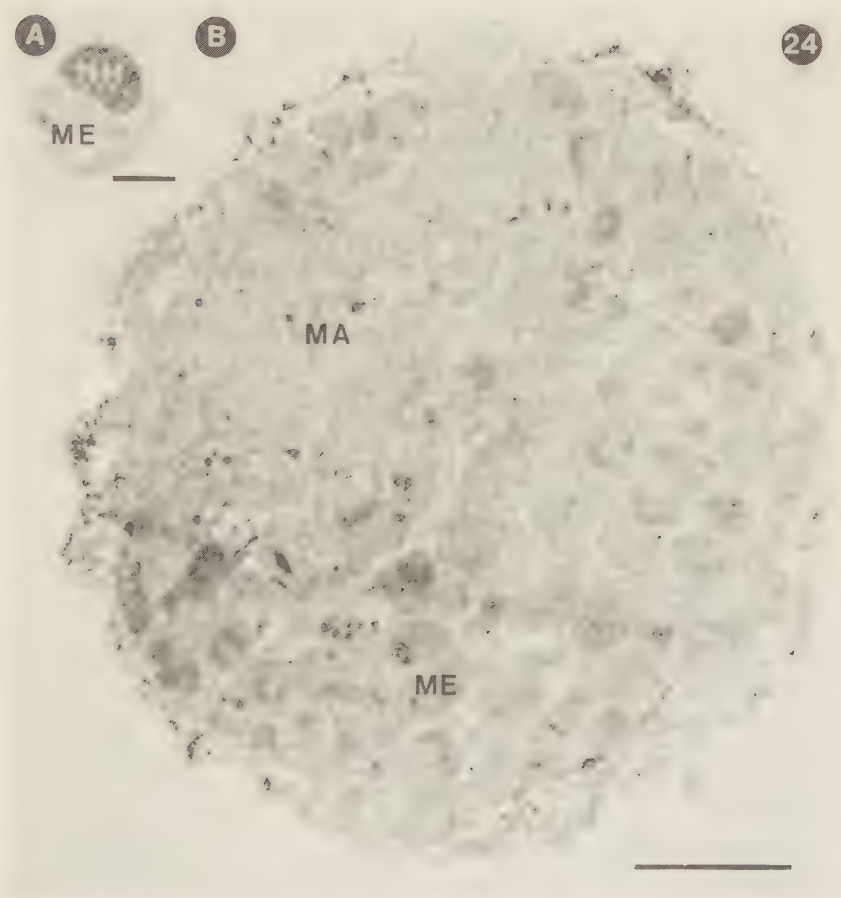
B

24

ME

MA

ME



auftraten (Abb. 26E). Die große Menge reifer Merozoiten schien eher nach Typ II gebildet zu werden. Dies führte zu fast vollständig mit Merozoiten angefüllten Zellen (Abb. 24C). Das Wirtszellplasma wurde bei diesem Vorgang weitgehend aufgebraucht. Durch Platzen der Zellmembran werden die reifen Merozoiten freigesetzt. Dies geschieht offensichtlich nicht synchron. Diese Merozoiten können dann in vivo in Erythrozyten eindringen oder sie bilden in Lymphozyten erneut Schizonten (Mehlhorn und Schein 1984). Ob die in vitro gebildeten Merozoiten auch in der Lage waren, in Erythrozyten einzudringen, wurde in den folgenden Experimenten untersucht.

4.5. In vitro Infektion von Rindererythrozyten durch in vitro gebildete Merozoiten von *T. annulata*

Die in vitro gebildeten Merozoiten wurden in den folgenden Versuchen auf ihre Infektiosität in vitro getestet. Dazu wurde ein Lymphozyten-Zellrasen, zur Zeit der maximalen Merozoitenbildung (s. 4.4. und Abb. 19), mit Rindervollblut oder gereinigten Rindererythrozyten überschichtet. In Ausstrichen und elektronenmikroskopisch konnten intraerythrozytäre Stadien von Theileria nachgewiesen werden (s. Abb. 4E, F und 23) .

Vereinzelte traten die Piroplasmen schon nach 2 h in den Erythrozyten auf. Regelmäßig konnten intraerythrozytäre Stadien aber erst nach 48 h in Ausstrichen gefunden werden. Maximalwerte wurden am dritten und vierten Tag erreicht (Abb. 25). Die Parasitämie war aber auch an diesen Tagen mit Spitzenwerten um 1 % sehr gering. Deutlichen Einfluß auf die Befallsrate der Erythrozyten hatten die Kulturbedingungen (s. Tab. 10).

Tabelle 10: Einfluß verschiedener Zellkulturbedingungen auf die Infektionsrate von Rindererythrozyten, 72 h nach Inkubation mit in vitro gebildeten Merozoiten von T. annulata. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung

Kulturbedingungen	Anteil infizierter Erythrozyten (%)	
	Vollblut	isolierte Erythrozyten
candle jar, 41 °C	0,7 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,3
candle jar, 37 °C	0,3 $\pm$ 0,3	0
5% CO ₂ , 41 °C	0,4 $\pm$ 0,3	0
5% CO ₂ , 37 °C	0	0
0,03% CO ₂ 41 °C	0	0
0,03% CO ₂ 37 °C	0	0

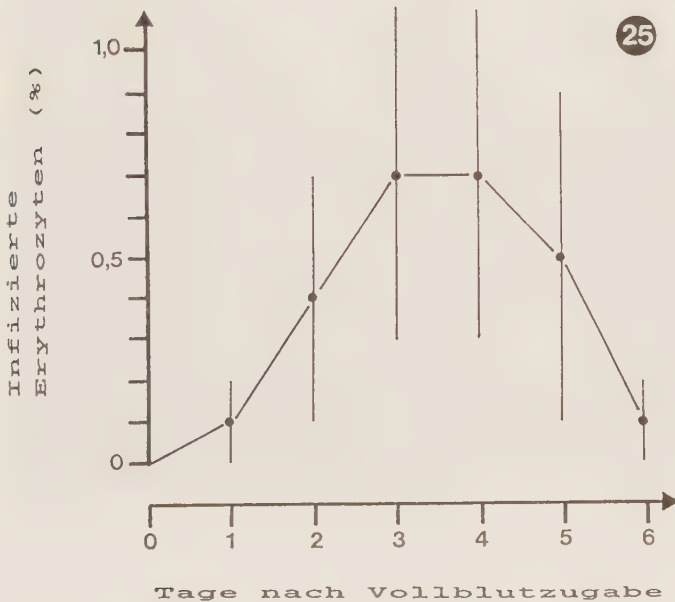


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der Erythrozyteninfektion durch in vitro gebildete Merozoiten bei 41 °C. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

Abbildung 26: Intraerythrozytäre Stadien von T. annulata.
72 h nach Vollblutzugabe (candle jar).

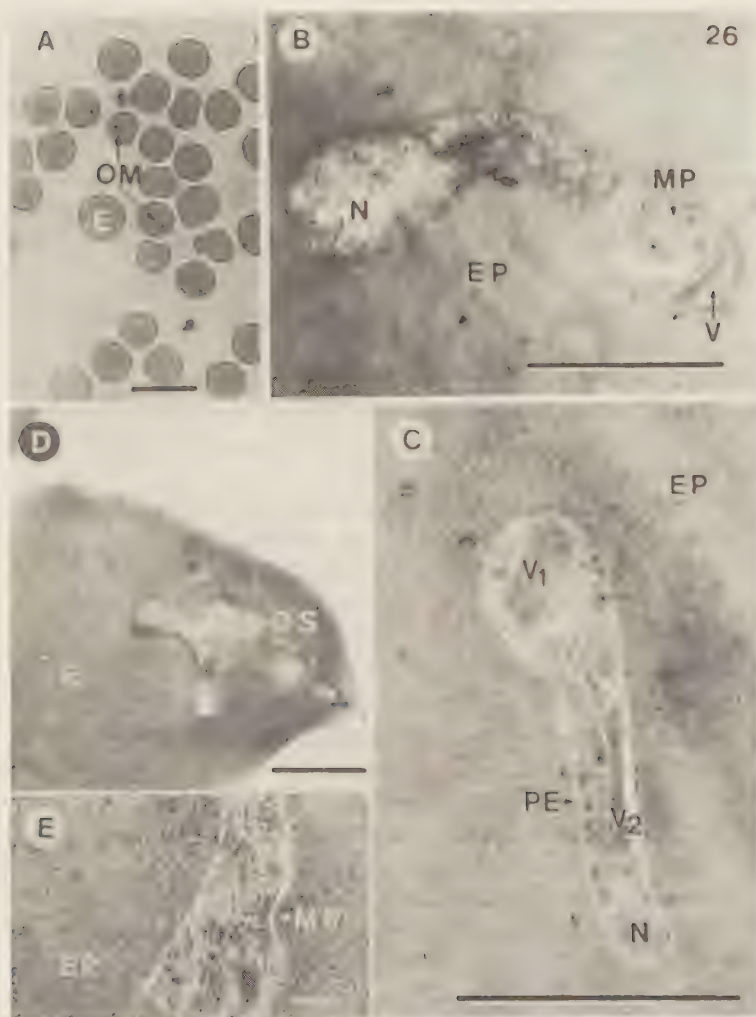
A: Übersicht mit ovoiden Stadien (OM) in den Erythrozyten (E). Maßstab: 10 μm .

B: Kommaförmiges Stadium direkt im Erythrozytenplasma (EP) mit Kern (N), Mikropore (MP) und doppelwandiger Vakuole (V). Maßstab: 0,5 μm .

C: In diesem kommaförmigen Stadium waren neben der, mit Erythrozytenplasma gefüllten, doppelwandigen Vakuole (V_1) auch noch eine zweite längliche, teilweise ebenfalls mit Plasma gefüllte Vakuole (V_2) sowie Reste der Pellikula (PE) zu sehen. Maßstab: 0,5 μm .

D: Intraerythrozytäres Teilungsstadium (DS). Maßstab: 1 μm .

E: Flache Mikropore (MP). Maßstab: 0,1 μm .



So erbrachte die candle jar-Methode die besten Ergebnisse. Bei dieser, von Jensen und Trager (1977) entwickelten, Methode wird der Sauerstoffgehalt der Atmosphäre über den Zellkulturen auf etwa 14 - 17 % verringert. Der Kohlendioxidgehalt beträgt dabei 3 % (Trager und Jensen 1980). Dabei war offensichtlich auch eine weiterhin auf 41 °C erhöhte Temperatur förderlich. Infizierte Erythrozyten konnten aber auch noch bei einem CO₂-Gehalt von 5 % (41 °C) gefunden werden. In einer nicht mit CO₂ angereicherten Atmosphäre fand eine Penetration der Erythrozyten nicht statt.

Weiterhin erwies sich die Verwendung von Vollblut (heparinisiert) als günstiger. In isolierten Erythrozyten konnten nur bei Anwendung der candle jar-Methode bei 41 °C Piroplasmen gefunden werden.

Die in 4.4. und hier beobachteten Ergebnisse wiesen darauf hin, daß durch eine Veränderung der Kulturbedingungen eine Steigerung sowohl der Merozoitenbildung als auch der Befallsrate der Erythrozyten erreicht werden könnte.

Zum eindeutigen Nachweis, daß es sich bei den in den Erythrozyten lichtmikroskopisch beobachteten Stadien um Theileria handelte, wurden elektronenmikroskopische Präparate angefertigt (Abb. 26).

Wie von den in vivo-Infektionen bekannt (Schein et al. 1977), traten in den Kulturen sowohl kommaförmige wie auch ovoide intraerythrozytäre Stadien auf. Mehrfachbefall mit 2 oder 3 Parasiten war nicht selten (s. a. Abb. 4E). Die Stadien waren zwischen 1 und 2,8 µm lang und etwa 0,3 - 0,6 µm breit. Sie lagen, umgeben von einer einfachen Zellmembran, direkt im Erythrozytenplasma. Reste der Pellicula waren unter der neuen Membran noch teilweise zu erkennen. Ein Pol war durch eine Mikropore gekennzeichnet, der andere durch den Kern (Abb. 26B,C). An dem der Mikropore zugeordneten Zellpol befand sich eine Vakuole, die teilweise mit elektronendichtem Material gefüllt war. Gelegentlich wurde in der Zellmitte eine zum

Teil längliche Vakuole angeschnitten, die ebenfalls elektronendichtes Material enthalten konnte (Abb. 26C). Lakunen des rauen Endoplasmatischen Retikulums und eine Vielzahl freier Ribosomen kamen regelmäßig vor (Abb. 26B). Die Ribosomen erreichten Größen von etwa 10 - 15 nm. Weitere Organellen wurden nicht angetroffen. Gelegentlich traten Teilungsstadien auf (Abb. 4E und 26D). Dabei handelte es sich offensichtlich um Zweiteilungen. Mehrfachteilungen wurden nicht beobachtet.

4.6. Einfluß verschiedener Substanzen auf die Merozoitenbildung und die Erythrozyteninfektion in vitro

Die nachfolgenden Versuche wurden, wie in 3.8. beschrieben, bei 41 °C und unter den für die Merozoitenbildung und Erythrozyteninfektion günstigsten Bedingungen (s. 4.4. und 4.5.) durchgeführt. Nach 7 Tagen bei 41 °C wurde ein Teil der Zellen fixiert, um den Einfluß auf die Merozoitenbildung zu untersuchen. Ein anderer Teil wurde zur Bestimmung der Erythrozyteninfektion für 72 h mit Vollblut überschichtet (s. 3.5.).

4.6.1. Substanzen mit inhibierender Wirkung

Die Substanzen, deren Wirkung auf das Schizontenstadium von T. annulata bei 37 °C getestet worden war (4.3.1.), dienten auch zur Untersuchung der Merozoitenbildung bei 41 °C. Dabei ergab sich, daß durch die Blockierung der Wirtszellmitose keine Synchronisierung der Merozoitenbildung erreicht werden konnte.

DMSO, Lösungsmittel einiger getesteter Substanzen, beeinflusste auch in 100facher Konzentration die Merozoitenbildung nicht (Tab. 11). Auch der Anteil para-

sitierter Erythrozyten erreichte die Kontrollwerte. Colchicin, in Konzentrationen von 0,001 $\mu\text{mol/l}$, hemmte die Mitose der Wirtszellen vollständig (s. auch 4.3.1.), unterdrückte die Merozoitenbildung aber auch etwa zu 50 %. Oberhalb 0,01 $\mu\text{mol/l}$ trat aber keine Merozoitenbildung mehr auf. Ähnlich verhielt sich Taxol, das unterhalb von 10 $\mu\text{mol/l}$ die Merozoitenbildung noch teilweise ermöglichte. Dabei waren keine Unterschiede zwischen 1 und 0,1 $\mu\text{mol/l}$ festzustellen. Die Infektion der Erythrozyten erreichte teilweise die Kontrollwerte.

Ein Viertel der Durchschnittswerte unbehandelter Kontrollen erreichten solche Zellen, deren Medium 1 % Polyethylenglykol enthielt. Höhere Konzentrationen ließen keine Merozoitenbildung und somit auch keinen Befall der Erythrozyten mehr zu.

Alle anderen untersuchten Substanzen (s. Tab. 11) störten, in den getesteten Konzentrationen, den Stoffwechsel und die Energiebilanz der Wirtszellen stark (Coffein, Dinitrophenol, Natriumazid) oder führten zu einer Lyse der Wirtszellen (Obioactin, TLA, Dexamethason, Prednisolon), so daß keine Merozoitenbildung mit nachfolgendem Befall geeigneter Erythrozyten stattfinden konnte.

Das Ausbleiben der Weiterentwicklung der Parasiten beruhte aber offensichtlich auf einer nachhaltigen Beeinflussung der Wirtszellen und weniger auf einer direkten Schädigung des Parasiten. So zeigten die ultrastrukturellen Untersuchungen ein ähnliches Bild wie bei den 37 °C Versuchen (s. Abb. 7, 9, 10, 13, 14 und 16). Auch der Grad der Schädigung der Wirtszellen entsprach diesen Versuchen.

Das Erscheinungsbild der Parasiten war von dem der Experimente bei 37 °C nicht zu unterscheiden. In den Fällen, wo eine Merozoitenbildung teilweise oder vollständig beeinträchtigt war, zeigten die Schizonten keine ultrastrukturellen Auffälligkeiten. Die in einigen Versuchen beobachten intraerythrozytären Stadien unterschieden sich elektronenmikroskopisch nicht von den in

den Kontrollen auftretenden (s. Abb. 24).

Tabelle 11: Einfluß verschiedener Substanzen auf die Merozoitenbildung und die Erythrozyteninfektion in vitro bei 41 °C.
Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

Substanz	Konzentration	Merozoitenbildung (%)	infizierte Erythrozyten (%)
Kontrolle		4,1 $\pm$ 0,9	0,7 $\pm$ 0,4
Coffein	5 mmol/l	0	0
Colchicin	0,001 μ mol/l	2,0 $\pm$ 1,0	0,4 $\pm$ 0,3
Colchicin	1 μ mol/l	0	0
Dexamethason	5 μ g/ml	0	0
Dexamethason	50 μ g/ml	0	0
DMSO	100 μ mol/l	4,0 $\pm$ 1,0	0,8 $\pm$ 0,4
Dinitrophenol	10 mmol/l	0	0
Natriumazid	100 mmol/l	0	0
Obioactin	1 mg/ml	0	0
Obioactin	10 mg/ml	0	0
Polyethylen-	1 %	1,0 $\pm$ 0,6	0,2 $\pm$ 0,1
glykol	10 %	0	0
Prednisolon	10 μ g/ml	0	0
Prednisolon	100 μ g/ml	0	0
Taxol	0,1 μ mol/l	2,5 $\pm$ 1,5	0,6 $\pm$ 0,3
Taxol	1 μ mol/l	2,5 $\pm$ 1,5	0,5 $\pm$ 0,3
Taxol	10 μ mol/l	0	0
Toxoplasma-	10 μ g/ml	0	0
Lysat-Antigen	100 μ g/ml	0	0

4.6.2. Substanzen mit potentiell stimulierender Wirkung

In den folgenden Versuchsreihen bei 41 °C wurde untersucht, ob durch bestimmte Medienzusätze eine höhere Merozoitenausbeute und eine Steigerung des Erythrozytenbefalls zu bewirken war.

Eine Mischung basischer Aminosäuren (Lysin, Histidin und Arginin) erbrachte durchschnittlich einen höheren Anteil merozoitenbildender Zellen (Tab. 12), der allerdings nicht signifikant von dem der Kontrollen verschieden war. Die anderen drei Aminosäuremischungen erreichten die Kontrollwerte, übertrafen diese jedoch nicht. Der prozentuale Anteil befallener Erythrozyten konnte durch die Zugabe von Aminosäuren nicht gesteigert werden.

Gestiegen war allerdings die Merozoitenausbeute nach Zusatz von Adenosintriphosphat, wobei die zusätzliche Gabe von 1 mmol/l ATP die besten Ergebnisse erbrachte. Hierbei stieg auch die Anzahl befallener Erythrozyten leicht an, bewegte sich aber im Fehlerbereich der Kontrollen.

Lymphozyten-Mitogene wie Concanavalin A oder Phythämagglutinin hingegen konnten weder den Anteil merozoitenbildender Zellen noch die Befallsrate der Erythrozyten steigern. Die Mittelwerte lagen in diesen Versuchen unter den Kontrollwerten.

Auch Calmodulin in Konzentrationen von 2,5 und 10 µg/ml führte nicht zu einer Erhöhung des Merozoitenanteils oder der Infektionsrate der Erythrozyten.

Das Tripeptid Glutathion hingegen, verabreicht in seiner reduzierten Form, führte, ähnlich wie die Mischung aus basischen Aminosäuren, zu einem Anstieg der Merozoitenbildung, allerdings nur in einer Konzentration von 50 µg/ml. Diese ergab auch durchschnittlich deutlich höhere Befallsraten bei den Erythrozyten. Höhere oder niedrigere Konzentrationen hingegen erreichten lediglich die Werte der Kontrollen.

Eine Ergänzung des Standard-Mediums mit Insulin (6 µg/ml) oder Transferrin (6 µg/ml) führte nur bei letzterem

zu einer leichten Steigerung des Anteils merozoitenbildender Zellen. Der Anteil parasitierter Erythrozyten erreichte hingegen nur knapp die Kontrollwerte.

Die Verbesserung der Nährstoff- und Energiesituation der Zellen durch die Zugabe von Glucose bewirkte eine deutliche Steigerung sowohl der Merozoitenbildung als auch der Erythrozyteninfektion. Allerdings schienen Konzentrationen über 10 mmol/l Glucose keine weitere Verbesserung darzustellen.

Die für viele Zellfunktionen notwendigen Ionen Ca^{++} und K^+ wurden als Calciumchlorid und Calciumnitrat bzw. Kaliumchlorid und Kaliumsulfat, in der Konzentration 1 mmol/l, dem Medium zugesetzt. Vor allem Calcium wirkte anscheinend eher blockierend auf die Merozoitenbildung, und auch der Anteil parasitierter Erythrozyten erreichte kaum die Hälfte der Kontrollwerte; dabei konnten keine Unterschiede zwischen Calciumnitrat und Calciumchlorid erkannt werden. Auch bei Kalium-Zugaben erreichten die Durchschnittswerte der Merozoitenbildung die Kontrollwerte nicht und lagen im Falle von Kaliumsulfat sogar deutlich darunter. Die Befallsrate der Erythrozyten hingegen war relativ hoch und übertraf im Mittel sogar, wenn auch nur geringfügig, die Kontrollwerte.

Der Zusatz von Nucleinsäuren erbrachte unterschiedliche Ergebnisse. 0,1 bzw. 1 $\mu\text{g/ml}$ t-RNA bewirkten keine Steigerung des Anteils merozoitenbildender Zellen und nur geringfügig erhöhte Befallsraten der Erythrozyten.

Die Zugabe von RNA hingegen ergab eine deutliche Steigerung der Erythrozyteninfektion.

Noch deutlicher fiel die Steigerung der Ergebnisse nach Zugabe von DNA aus. Hierbei wurden mit die höchsten Anteile merozoitenbildender Zellen ($5,6 \pm 1,2 \%$) und parasitierter Erythrozyten ($1,4 \pm 0,6 \%$) erreicht.

Diese konnten aber durch Erhöhung der DNA-Konzentration nicht weiter gesteigert werden.

Tabelle 12: Einfluß verschiedener Substanzen auf die Merozoitenbildung und die Erythrozyteninfektion in vitro bei 41 °C. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

Substanz	Konzentration	Merozoitenbildung (%)	infizierte Erythrozyten (%)
Kontrolle		4,1 $\pm$ 0,9	0,7 $\pm$ 0,4
Aminosäuren*	basische geladen polar ungel. polar nicht polar	4,9 $\pm$ 1,0 4,1 $\pm$ 0,8 4,0 $\pm$ 0,8 3,8 $\pm$ 0,7	0,8 $\pm$ 0,4 0,8 $\pm$ 0,4 0,7 $\pm$ 0,3 0,6 $\pm$ 0,3
Adenosin- triphosphat	1 mmol/l 10 mmol/l	5,0 $\pm$ 1,3 4,6 $\pm$ 1,1	0,9 $\pm$ 0,4 0,7 $\pm$ 0,3
Calcium- chlorid	1 mmol/l	2,5 $\pm$ 1,1	0,3 $\pm$ 0,2
Calciumnitrat	1 mmol/l	2,7 $\pm$ 1,3	0,3 $\pm$ 0,2
Calmodulin	2,5 μ g/ml 10 μ g/ml	3,3 $\pm$ 1,0 3,1 $\pm$ 1,0	0,6 $\pm$ 0,3 0,5 $\pm$ 0,3
ConcanavalinA	0,1 μ g/ml 1 μ g/ml	4,0 $\pm$ 0,9 3,8 $\pm$ 0,9	0,6 $\pm$ 0,3 0,4 $\pm$ 0,3
DNA	2,5 μ g/ml 5 μ g/ml	5,6 $\pm$ 1,2 5,0 $\pm$ 1,2	1,4 $\pm$ 0,6 1,0 $\pm$ 0,4
Fötales Kälbererum	20 % 50 %	5,5 $\pm$ 1,0 5,4 $\pm$ 1,0	1,4 $\pm$ 0,5 1,3 $\pm$ 0,4
Glucose	10 mmol/l 100 mmol/l	5,3 $\pm$ 1,1 5,2 $\pm$ 1,1	1,1 $\pm$ 0,4 0,9 $\pm$ 0,4
Glutathion	10 μ g/ml 50 μ g/ml 100 μ g/ml	3,9 $\pm$ 0,9 4,9 $\pm$ 0,9 4,2 $\pm$ 0,9	0,5 $\pm$ 0,2 1,0 $\pm$ 0,3 0,8 $\pm$ 0,3
Insulin	6 μ g/ml	4,1 $\pm$ 1,0	0,6 $\pm$ 0,3
Kaliumchlorid	1 mmol/l	3,8 $\pm$ 0,9	0,8 $\pm$ 0,4
Kaliumsulfat	1 mmol/l	3,2 $\pm$ 0,8	0,6 $\pm$ 0,3
Phyt- hämagglutinin	0,1 μ g/ml 1 μ g/ml	3,2 $\pm$ 0,9 3,5 $\pm$ 1,0	0,5 $\pm$ 0,3 0,5 $\pm$ 0,3
RNA	5 μ g/ml 50 μ g/ml	4,1 $\pm$ 1,0 3,8 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,4 1,2 $\pm$ 0,4
t-RNA	0,1 μ g/ml 1 μ g/ml	3,0 $\pm$ 1,0 3,1 $\pm$ 1,0	0,8 $\pm$ 0,4 0,9 $\pm$ 0,4
Transferrin	6 μ g/ml	4,6 $\pm$ 1,2	0,6 $\pm$ 0,3

* Zusammensetzung siehe 4.3.2.

Die Verdoppelung des fötalen Kälberserum-Anteils im Versuchsmedium auf 20 % bewirkte ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Merozoitenbildung und des Erythrozytenbefalls. Eine weitere Erhöhung des Serumanteils auf 50 % ergab keine weitere Verbesserung.

4.6.3. Optimierte RPMI-Vollmedium

Da in den vorhergehenden Versuchen (4.6.2.) eine Steigerung der Merozoitenbildung und des Erythrozytenbefalls durch Zusätze einzelner Substanzen erreicht werden konnte, wurden die am besten wirkenden Substanzen in folgenden Kombinationen getestet :

A: Fötales Kälberserum 20% (Endkonzentration im Medium)
 Glucose 10 mmol/l
 ATP 1 mmol/l

B: Fötales Kälberserum 20%

Arginin	200 mg/l
Asparaginsäure	20 mg/l
Cystein	50 mg/l
Histidin	20 mg/l
Isoleucin	50 mg/l
Lysin	40 mg/l
Methionin	30 mg/l
Prolin	20 mg/l
Serin	30 mg/l
Threonin	20 mg/l
Glutathion (red.)	50 mg/l

C: Calciumchlorid 1 mmol/l
 Calmodulin 2,5 mg/l

D: Fötiales Kälberserum 20%

DNA 2,5 mg/l

RNA 5,0 mg/l

In diesen Kombinationen konnten keine additiven Wirkungen festgestellt werden; so wurden bei Kombination A, mit $5,2 \pm 1,0$ % merozoitenbildenden Zellen und mit $1,1 \pm 0,5$ % befallenen Erythrozyten, kaum die Spitzenwerte der einzelnen Substanzen erreicht. Ähnlich verhielt es sich bei den Kombinationen B und D. Der Mittelwert in Kombination B lag mit $5,5 \pm 1,1$ % merozoitenbildenden Zellen und einer Erythrozytenbefallsrate von $1,2 \pm 0,5$ % über den Mittelwerten der Aminosäuremischungen und des Glutathions (s. Tab. 12). Die Wirkung des auf 20 % erhöhten Serumanteils alleine wurde aber nicht übertroffen.

Mit Kombination D wurden die Höchstwerte erreicht. Hier konnten, mit $5,7 \pm 1,3$ % in Merozoitenbildung befindlicher Zellen und mit $1,5 \pm 0,6$ % befallener Erythrozyten, die Werte der einzelnen Substanzen übertroffen werden. Eine deutliche Steigerung ergab sich aber aufgrund der Streubreite in den einzelnen Versuchen nicht.

Mischung C kombinierte Calciumionen mit dem Modulatorprotein Calmodulin. Aber auch hier, wie in den Einzelversuchen, trat keine Optimierung der untersuchten Prozesse auf. Die Werte lagen zwar mit $3,6 \pm 1,0$ % Merozoitenbildung und mit $0,7 \pm 0,4$ % befallenen Erythrozyten leicht über den Einzelwerten von Calmodulin und Calciumchlorid, übertrafen aber die Kontrollwerte nicht.

In den folgenden Versuchen wurden die Kombinationen A, B und D vereinigt, so daß die in den Einzelversuchen wirksamsten Substanzen kombiniert waren:

RPMI 1640 Vollmedium (s.3.4)

Fötales Kälberserum	10 % (insgesamt also 20 %)
Adenosintriphosphat (Serva)	2 mmol/l
Glucose (Merck)	10 mmol/l
DNA-Lösung (Boehringer)	0,5 ml/l
RNA (Boehringer)	5 mg/l
Gluthation reduziert (Serva)	50 mg/l
Arginin (Serva)	200 mg/l
Asparaginsäure (Serva)	20 mg/l
Cystein (Serva)	50 mg/l
Histidin (Serva)	20 mg/l
Isoleucin (Serva)	50 mg/l
Lysin (Serva)	40 mg/l
Methionin (Serva)	30 mg/l
Prolin (Serva)	20 mg/l
Serin (Serva)	30 mg/l
Threonin (Serva)	20 mg/l

Hierdurch konnte gegenüber den Einzelsubstanzen und vorherigen Kombinationen ein deutlicher Anstieg merozoitenbildender Zellen beobachtet werden. Maximalwerte erreichten über 7 %, der Mittelwert lag bei $6,1 \pm 1,1$ %. Auch die Befallsrate der Erythrozyten stieg im Mittel auf $1,5 \pm 0,4$ % an, lag damit aber nur geringfügig über den zuvor erzielten Ergebnissen.

Ein mit diesen Substanzen ergänztes Standard-Medium wird weiterhin als O-RPMI-Medium bezeichnet.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Kombinationen wurden auch bei 37 °C getestet. In keinem Fall, auch nicht bei Verwendung des O-RPMI-Mediums, konnte eine Merozoitenbildung, und somit auch kein Befall von Erythrozyten, festgestellt werden. Dies galt auch für Versuche, in denen die Versuchsdauer auf 30 Tage (bei 37 °C und täglichem Medienwechsel) ausgedehnt worden war.

5. DISKUSSION

Das Eindringen von Theileria-Sporozoiten stellt einen erheblichen Eingriff in den Zellzyklus der befallenen Zellen dar, weil der Parasit die Teilung der Lymphozyten induziert, die normalerweise nicht mehr stattfindet. (Hulliger 1964). Die so zu Lymphoblasten gewordenen Zellen besitzen, solange sie parasitiert sind, eine an Tumore erinnernde unbegrenzte Proliferationsfähigkeit (Pinder et al. 1981; Dobbelaere et al. 1988). Dies führt zu einer starken Expansion der Erreger im Wirbeltier.

Der exakte Ablauf der Parasitenvermehrung und Verteilung auf die Tochterlymphozyten ist nur teilweise verstanden. Offensichtlich erfolgt aber die Verteilung der Parasiten auf die Tochterlymphoblasten durch einen engen Kontakt der Schizontenpartikel mit den Spindelmikrotubuli der Wirtszelle (s.a. Abb. 4C sowie Hulliger 1965; Stagg et al. 1980). Trotz der Verwendung standardisierter und ergänzter Vollmedien wurde aber eine Weiterentwicklung der Schizonten zu Merozoiten in vitro nur gelegentlich beobachtet (s. a. 2.3.).

Denkbare Auslöser der Merozoitenbildung in vivo sind neben einem vorprogrammierten zeitlichen Verlauf eine kritische Schizontengröße, d. h. eine bestimmte Anzahl Kerne pro Schizont bzw. pro Wirtszelle, sowie ein Einfluß der erhöhten Körpertemperatur oder einer induzierenden Substanz. In vitro fehlt dieser Auslöser anscheinend. Möglich wäre auch, daß die Nährstoffversorgung in den Kulturen für eine Merozoitenbildung suboptimal ist. In dieser Untersuchung wurden drei dieser Ansätze überprüft:

1. der Einfluß der Schizontengröße;
2. Verbesserung der Nährstoffsituation;
3. erhöhte Körpertemperatur von 41 °C.

Eine einfache zeitliche Abhängigkeit scheint in vitro nicht zu bestehen, da Schizontenkulturen, künstlich mit Sporozoiten infiziert oder aus Lymphknotenbiopsien erkrankter Tiere isoliert, beliebig lange in Kultur gehalten werden können, ohne daß eine reproduzierbare Merozoitenbildung auftritt (Brocklesby und Hawking 1958; Brown 1983; 1987). Ein Zusammenwirken mehrerer Faktoren erscheint aber wahrscheinlich, da bei in vivo Infektionen annähernd konstante zeitliche Verläufe beobachtet wurden (Levine.1973; Mehlhorn und Schein 1984). Dabei müssen individuelle Reaktionen auf unterschiedlich starke Inokulationen berücksichtigt werden (Barnett 1977).

Als Vergleichsbasis wurden die Normalbedingungen der untersuchten Kulturen ermittelt und mit den Werten anderer Kulturen von T. annulata und T. parva verglichen. Die mittlere Generationszeit der hier untersuchten Kulturen von 17 - 20 h stimmte dabei mit Generationszeiten anderer Theileria-Kulturen überein (Hulliger et al. 1964; Brown 1979).

Im Vergleich der beiden Zählmethoden zeigte sich, daß bei der Haemocytometer-Methode durch die zusätzlichen Arbeitsschritte (Ablösen der Zellen, Abzentrifugieren) gegenüber dem direkten Zählverfahren Verluste vorkamen. Da jedoch keine signifikanten Unterschiede auftraten, lassen sich die Ergebnisse beider Verfahren zu Vergleichen heranziehen.

Aufgrund gelegentlicher Asymmetrie bei der Verteilung und aufgrund der Tatsache, daß weder die Teilung der Wirtszellen noch die der Parasiten in einer Kultur synchronisiert ist, werden unterschiedliche Anzahlen Schizontenkerne pro Wirtszelle beobachtet. Dazu trägt auch ein möglicher Mehrfachbefall bei. Trotzdem ist in vivo wie in vitro die Anzahl der Schizontenkerne relativ konstant. So stimmte der gefundene Mittelwert von $13,0 \pm 4,5$ Schizontenkerne pro Wirtszelle recht gut mit den Werten anderer Autoren für T. annulata-Kulturen überein (s. z.B. Hulliger 1965).

Der hohe Anteil von über 95 % lebenden Zellen in der Kultur wies, ebenso wie das gute Wachstum der Kultur, auf günstige Kulturbedingungen hin.

So konnte auch ein Einfluß des Kulturalters auf die untersuchten Parameter nicht festgestellt werden. Insbesondere die Teilungsraten und die Anzahl der Schizontenkerne pro Wirtszelle blieben über mehr als 100 Passagen konstant. Trotzdem scheinen Veränderungen während längerer in vitro Haltung aufzutreten. So ist bekannt, daß die Virulenz von T. annulata nach fortgesetzter in vitro Züchtung abnimmt. Dabei wurden zunächst mildere Symptome beobachtet (Tsur et al. 1964; Hashemi-Fershaki und Shad-Del 1973). Nach längeren Kulturzeiten treten keine klinischen Symptome mehr auf und weder Schizonten noch erythrozytäre Stadien können nach Inokulation gefunden werden (Pipano und Tsur 1966; Pipano 1979). Solche vollständig attenuierten Schizonten finden als Vakzine ihre Anwendung (s. 2.5.). Die Vorgänge, die zum Verlust der Virulenz führen, sind nicht bekannt. Es scheint aber kein Zusammenhang zwischen der Virulenz der verschiedenen Isolate und dem Zeitraum von wenigen Monaten bis zu drei Jahren, der zur Attenuierung benötigt wird, zu bestehen (Pipano 1979). Bemerkenswert ist, daß, trotz Wachstum in vitro, in vivo offenbar keine Merozoiten und erythrozytären Stadien mehr gebildet werden. Die Fähigkeit zur Merozoitenbildung scheint also während der in vitro Haltung vollständig verloren gegangen zu sein.

Da das Alter der Kulturen für die Merozoitenbildung also doch entscheidend sein könnte, war es notwendig, Kulturen nach verschiedenen Passagen tiefgefroren lagern zu können, um ständig Kulturen bestimmten Alters zur Verfügung zu haben. Eine Vielzahl verschiedener Methoden wurde dazu beschrieben (s. 4.2.). Neuere Untersuchungen von Wathanga et al. (1986) zeigen, daß auch für T. annulata eine zweistufige Methode gegenüber den häufig verwendeten kontinuierlichen Einfriermethoden bessere Überlebenschancen bietet. Die geringsten Chancen ergaben sich bei

schnellen Kühlraten von 100 - 200 °C/min, da bei diesen die Zellen keine Gelegenheit zu schrumpfen haben und durch intrazelluläre Eisbildung zerstört werden können (Wathanga et al. 1986; James 1988). Die Verwendung von DMSO oder Glycerin als Gefrierschutzmittel führte zu einer Verbesserung der Ergebnisse. Langsame und mittlere Abkühlraten von 1- 10 °C/min bieten bessere Überlebenschancen (Meryman und Weinman 1968). Die besten Ergebnisse von 95 - 97 % überlebender Zellen erzielten Wathanga und Mitarbeiter aber mit einem zweistufigen Verfahren. Dabei wurde die Zellsuspension mit 5 - 15 % DMSO auf -30 °C abgekühlt und verblieb dort für 20 - 30 Minuten. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Auch humane Lymphozyten zeigten bei einer zweistufigen Methode die besten Ergebnisse (Knight 1980). Daß die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit 75 % überlebender Zellen nicht die oben zitierten Werte erreichten, lag möglicherweise daran, daß das -30 °C Plateau nicht schnell genug erreicht werden konnte. Eventuell hätten auch deutlich höhere DMSO-Konzentrationen von 20 % bessere Ergebnisse erbracht. Auf die Vorteile eines solch hohen DMSO-Gehalts für Wiederkäuerblut deuten die Ergebnisse von Oliver et al. (1984) sowie Kemp und Teal (1984) hin. Deren Ergebnisse bei Verwendung des üblichen zehnprozentigen DMSO-Anteils entsprach hingegen, mit etwa 70 % Überlebensrate, den in dieser Untersuchung gefundenen Werten. Bei Verwendung von 20 % DMSO wurden allerdings 80 - 90 % überlebende Zellen gefunden. Da DMSO in den verwendeten Konzentrationen für Lymphozyten bei 37 °C toxisch ist, bot die Verwendung eines niedrigen DMSO-Gehaltes von 7,5 % bei guten Überlebensraten die sicherste Möglichkeit zur Lagerung der verwendeten Kulturen. Nicht unkritisch ist auch das Auftauen der Zellen, da häufig erst hierbei die Zellen zerstört werden. Für Theileria-haltige Lymphozyten hat sich dabei ein schnelles Auftauen in einem 37 - 40 °C Wasserbad und ein stufenweiser Austausch des DMSO-haltigen

Mediums gegen normales Vollmedium bewährt (Brown 1983; Wathanga et al. 1986).

Blockierung der Wirtszellmitose

Die Mitose der Wirtszellen wurde mittels verschiedener Substanzen blockiert, um zu untersuchen, ob die Merozoitenbildung von T. annulata durch Entkoppelung der Teilungen von Wirtszelle und Parasit zu erreichen war. Die Auswirkungen der Versuche auf die Merozoitenbildung konnten nur nach unüblich langen Inkubations- und Nachbeobachtungszeiten von bis zu 10 Tagen beurteilt werden, da erst nach 3 - 6 Tagen der Beginn einer eventuellen Merozoitenbildung beobachtet werden kann (Abb. 18 und 19).

Colchicin erwies sich bei den Untersuchungen als stark toxisch für die Lymphoblasten (7B). Dabei schienen die verwendeten Rinderlymphozyten die Colchicininkubation noch besser zu tolerieren als menschliche Lymphozyten. Trowell (1960) beschreibt, daß 50 % dieser stimulierten Zellen in Kultur nach 48 h schon bei Konzentrationen von 0,23 $\mu\text{mol/l}$ abgestorben waren.

Obwohl die Zellen teilweise stark geschädigt waren (5 $\mu\text{mol/l}$; 168 h; Abb. 3B), kam es nach 96 h noch zu einem signifikanten Anstieg der Schizontenkernzahl pro Wirtszelle. Das bedeutet, daß die Teilung der Parasitenkerne offensichtlich nicht vollständig durch Colchicin inhibiert worden war. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Hulliger et al. (1964). Sie beobachteten einen Anstieg der Theileria-Kernzahl nach Behandlung mit 75 nmol/l Colchicin nach 24 und 48 h. Da dieser Effekt der Schizontenkernvermehrung nach 96 h bei allen getesteten Konzentrationen von 0,001 bis 5 $\mu\text{mol/l}$ auftrat (s. auch Fritsch et al. 1988), schien es sich um einen zeitabhängigen Prozess zu handeln. Ein weiterer Anstieg wurde bis 168 h nicht beobachtet. Hier wirkte sich dann offensichtlich eine selten berücksichtigte Wirkung des Colchicins, nämlich eine Reduzierung der DNA-Synthese, aus. Diese Wirkung auf den Parasiten

schien auch schon nach kürzeren Inkubationszeiten vorhanden gewesen zu sein, was die relativ lange Zeit von 96 h erklärt, die für einen signifikanten Anstieg der Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle benötigt wurde. Bei noch längeren Inkubationszeiten als 96 h überlagern sich die Effekte durch die zunehmend geschädigte Wirtszelle, was, zumindest bei höheren Konzentrationen, auch zu einer Verschlechterung der Nährstoffversorgung des Parasiten führen kann, und die Störung der DNA-Synthese des Parasiten durch die direkte Wirkung des Colchicins. Daß eine Reduktion der DNA-Synthese durch Colchicin hervorgerufen werden kann, konnten Hell und Cox (1963) an epidermalen Zellen vom Meerschweinchen zeigen. Sie beobachteten Reduktionen von bis zu 22 % nach nur 1 h Behandlungsdauer mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Colchicin. Auch Fitzgerald und Brehaut (1970) fanden eine Reduzierung der DNA-Syntheserate und des Mitoseindex bei menschlichen Lymphozyten, die mit Phythämagglutinin stimuliert waren, durch Colchicin-Konzentrationen von 12,5 $\mu\text{mol/l}$. Sie befanden, daß der Haupteffekt von Colchicin in ihren Experimenten darin bestand, Zellen vom Beginn der DNA-Synthese abzuhalten beziehungsweise die Syntheserate derjenigen Zellen zu reduzieren, die bereits damit begonnen hatten. Diese Ergebnisse stimmen auch recht gut mit den bei T. annulata infizierten Lymphozyten gefundenen Werten überein, wo die intrazellulären Parasiten offensichtlich weniger anfällig waren als die Wirtszellen. Sie reagierten zumindest später auf die verwendeten Konzentrationen, da bis etwa 96 h noch DNA-Synthese, wenn vielleicht auch eingeschränkt, stattgefunden haben mußte, worauf die Vermehrung der Anzahl Schizontenkerne hinweist. Eine Merozoitenbildung konnte aber durch diese Versuche nicht induziert werden, was möglicherweise an der zu geringen Zeit lag, die den Parasiten zur Verfügung stand, bis auch sie von der blockierenden Wirkung des Colchicins ganz inhibiert waren.

Taxol, ein von Wani et al. (1971) aus der Rinde von Taxus brevifolia isoliertes Diterpen, besitzt die Fähigkeit, die Teilung verschiedener Zelltypen zu blockieren. So wurde die Inhibition von Tumoren (Wani et al. 1971), HeLa-Zellen (Schiff et al. 1979), Maus-Fibroblasten (Schiff und Horwitz 1980) und von Heuschrecken Spermatozyten (Daub und Hauser 1988) beobachtet. Auch parasitische Protozoen wie Trypanosoma cruzi (Baum et al. 1981) oder Trichomonas vaginalis (Juliano et al. 1986) wurden inhibiert. Die Wirkung des Taxols bestand dabei in einer Verringerung der kritischen Tubulinkonzentration, die zu einem Anstieg zytoplasmatischer Mikrotubuli führte (Schiff et al. 1979). Diese zytoplasmatischen Mikrotubuli waren zudem noch stabiler gegen hohe Ca^{2+} -Konzentrationen oder niedrige Temperaturen von 4 °C (Parness und Horwitz 1981). Die Zellen wurden in der G₂- oder M-Phase arretiert (Schiff und Horwitz 1980). Offensichtlich bewirkte Taxol dabei einen massiven Eingriff in das Mikrotubuli organisierende Zentrum der Zellen, da vorhandene Mikrotubulimuster zunächst abgebaut und später verändert wieder aufgebaut wurden (DeBrabander et al. 1981). Die Mikrotubuli organisierenden Zentren verschiedener Protozoen erwiesen sich teilweise weniger anfällig gegenüber Taxol als Säugerzellen (Hausmann et al. 1983; Hauser 1986).

T. annulata-befallene Lymphoblasten verhielten sich wie die oben beschriebenen Säugerzellen und reagierten schon auf geringe Konzentrationen von Taxol (Abb. 4C). Bei allen Konzentrationen konnten typische zytoplasmatische Mikrotubulibündel beobachtet werden (Abb. 7C und 7D). Da sich die Parasiten als widerstandsfähiger gegenüber Taxol erwiesen, führten Konzentrationen von 1 - 10 µmol/l bei gleichzeitiger Inhibition der Wirtszellen, zu einer annähernden Verdoppelung der Schizontenkernzahlen pro Zelle nach 24 h. T. annulata reagierte dabei offensichtlich weniger empfindlich als Trypanosoma cruzi, deren Replikation schon bei Konzentration von 1 nmol/l an

inhibiert war (Baum et al. 1981), während Trichomonas vaginalis weniger empfindlich auf Taxol reagierte, da hierbei erst ab 1 $\mu\text{mol/l}$ konzentrationsabhängige Inhibition gefunden wurde (Juliano et al. 1986). Daß niedrigere Taxolkonzentrationen als 1 $\mu\text{mol/l}$ zu keinem oder nur zu einem geringen Anstieg der Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle führten, kann auf die Nicht- oder nur Teilblockierung der Wirtszellmitose zurückgeführt werden. Denn nur bei vollständig blockierten Lymphozyten, ab 1 $\mu\text{mol/l}$ Taxol, konnte sich eine Vermehrung der Parasitenkerne in einem Anstieg pro Wirtszelle bemerkbar machen. Betrachtet man deshalb nur die Fälle vollständiger Wirtszellinhibition (Abb 6 B,C), fällt auf, daß die Anzahl der Schizontenkerne pro Zelle bis 24 h sich annähernd verdoppelt hatte, danach aber nur noch geringfügige Unterschiede auftraten. Das bedeutet, daß anscheinend auch die Teilung der Schizontenkerne gestört war. Da bei der Teilung der Parasiten intranucleare Spindeln ausgebildet werden (Mehlhorn und Schein 1984), ist wahrscheinlich, daß durch die Störung der Spindelmikrotubuli die Mitose des Parasiten, zumindest weitgehend, blockiert war. Möglicherweise kam es aber auch zu Polyploidiesierungen. Dagegen spricht allerdings, daß keine Vergrößerung der Schizontenkerne festgestellt werden konnte. Messungen des DNA-Gehaltes an Taxol-behandelten Schizonten könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.

Sowohl Wirtszellen wie auch Parasiten wurden bei längeren Inkubationszeiten durch Taxol blockiert; so konnte eine Merozoitenbildung in vitro nicht beobachtet werden.

Substanzen wie Polyethylenglykol, Natriumazid, 2,4-Dinitrophenol oder Coffein wirken nicht direkt auf den Teilungsapparat. Sie beeinflussen vielmehr den Stoffwechsel der Wirtszellen (s.4.3.1.). Im Falle von Polyethylenglykol führte das bei hohen

Konzentrationen von 10 % und Versuchszeiten über 96 h zu einer teilweisen Verringerung der Zellvermehrung. Gleichzeitig waren aber auch die Parasiten davon betroffen, so daß es nicht zu einer Entkoppelung von Wirtszell- und Parasitenmitose kam. Darauf deutet auch die gegenüber den Kontrollen unveränderte Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle hin (Abb. 8B). Die im Zytoplasma auftretenden Schädigungen verhinderten einen weiteren Teilungszyklus der Wirtszelle nicht (Abb. 9A,B). Offensichtlich war die mitogene Wirkung des Parasitenbefalls stark genug, normale Regulationsmechanismen der Zelle zu überlagern. Eine Veränderung in der Anzahl Schizontenkerne pro Zelle war auch bei Natriumazid und Coffein nicht feststellbar (Tab. 3). Sowohl Wirtszellen wie auch Schizonten waren von den Schädigungen betroffen (Abb. 9C, D und 10A,B), so daß es auch bei diesen Substanzen nicht zu einer Merozoitenbildung kommen konnte.

2,4-Dinitrophenol wirkte auf die Parasiten stärker als auf die Wirtszellen. Darauf deutet die Verringerung der Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle hin. Die Parasiten verlassen aber anscheinend nicht die Wirtszelle, da der prozentuale Anteil parasitierter Zellen gegenüber den Kontrollen unverändert blieb. Vielmehr war offenbar zunächst die Vermehrung der Parasiten gestört, während die Wirtszellen, zumindestens teilweise, noch zu einer Teilung fähig gewesen waren. Dies führte dann möglicherweise zu einer Verteilung der vorhandenen Parasitenkerne via Wirtszellmitose. Später waren dann auch die Lymphozyten vollständig inhibiert und es kam nach 72 - 96 h zu einer verringerten Anzahl Schizontenkerne pro Zelle. Alle diese Substanzen konnten aber die Teilung von Wirtszelle und Parasit nicht so trennen, daß eine kritische Schizontengröße entstehen konnte. Eine Merozoitenbildung war aufgrund der beobachteten Schädigungen von Wirtszellen und/oder Parasiten nicht möglich.

Obioactin, eine enzymatisch hydrolysierte Fraktion aus Toxoplasma-immunem Rinderserum, und Toxoplasma-Lysat-Antigen (TLA) besitzen toxoplasmaeide Aktivität in homologen und heterologen Zellkulturen (Igarashi et al. 1979; Suzuki et al. 1984a). Darüber hinaus erwiesen sich mit TLA und/oder Obioactin sensitivierte Mäuse immun gegen Plasmodium berghei (Omata et al. 1979; 1980; 1981), Babesia rodhaini (Ogawa et al. 1985), Toxoplasma gondii und Trypanosoma cruzi (Suzuki et al. 1984b; Osaki et al. 1984).

In vivo besteht die Wirkung in einer Aktivierung von T-Lymphozyten und der Produktion von Lymphokinen, so daß über eine gesteigerte Aktivität von Makrophagen eine wirkungsvolle Immunantwort gegen diese Infektionen erreicht wurde (Suzuki et al. 1987). In Monolayern aus peritonealen Makrophagen von Mäusen, die mit verschiedenen Viren infiziert waren, wurden bei Konzentrationen von 5 - 10 mg/ml Obioactin teilweise Inhibition und zytotoxische Reaktionen gegenüber den Kulturzellen nach 24 h beobachtet (Osaki et al. 1984). Suzuki et al. (1984b) beobachteten ähnliche zytotoxische Effekte bei Toxoplasma-enthaltenden Monozyten-Monolayern von Rindern bei Obioactinkonzentrationen oberhalb 1 %.

Diese Beobachtungen stimmen recht gut mit den Ergebnissen von T. annulata-infizierten Rinderlymphozyten in vitro überein (Abb. 11). Die Lymphozyten starben aber nicht alle ab. So konnten nach 144 h in den Kulturen immer noch 1-2 % der Ausgangspopulation lebend gefunden werden (Abb. 11). Diese überlebenden Zellen besaßen eine statistisch von den Kontrollen nicht zu unterscheidende Anzahl an Schizontenkernen. Da keine Mitosestadien dieser Zellen gefunden werden konnten, deutet dies darauf hin, daß auch die Parasiten inhibiert waren. Die Wirkung der Substanzen in vivo führte anscheinend über eine Aktivierung des Immunsystems befallener Wirte zu einem Schutz gegen protozoäre Parasiten. Ähnliche Erfolge bei diesen Untersuchungen konnten daher in vitro nicht erwartet werden.

Bemerkenswert waren die ultrastrukturellen Ergebnisse, da vollständig zerstörte Zellen auftraten, die ein Schadensbild aufwiesen, das dem mit Glucocorticosteroiden behandelten Zellen entsprach (Abb. 16). Möglicherweise können Obioactin und TLA auch direkt auf die DNA einwirken, da Verklumpungen des Chromatins, ähnlich wie bei den Glucocorticosteroiden, beobachtet wurden. Neben diesen extrem geschädigten Zellen traten aber immer, wenn auch nur in geringer Anzahl, anscheinend vollständig intakte Zellen auf (Abb. 13 und 14). Praktisch alle diese Zellen kamen in Aggregaten von bis zu zehn Zellen vor. Der größte Teil dieser Aggregate bestand aber aus zwei bis drei Zellen. Die Zellen enthielten Schizonten, die allerdings nur wenige Kerne besaßen und recht klein waren, aber keine offensichtlichen Schädigungen aufwiesen. Die großen Zellen enthielten oftmals vier oder mehr dieser kleinen Schizonten.

In einigen wenigen Fällen wurde sowohl bei Obioactin als auch bei TLA eine Auflösung der Zellgrenzen beobachtet (Abb. 14). Dies deutet darauf hin, daß die großen Zellen möglicherweise durch Verschmelzung entstanden sind. Auch die Anzahl kleiner Schizonten könnte darauf hinweisen. Mehrere Kerne wurden in den großen Zellen jedoch nicht angetroffen. Der genaue Mechanismus, der zu den Zellverschmelzungen führte und die Frage, ob diese die Überlebensfähigkeit der Zellen verbesserte, müssen durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Ebenso ungeklärt bleibt, ob in vivo diese Zellen eine Funktion im Rahmen des ausgebildeten Immunschutzes gegen verschiedene protozoäre Erkrankungen haben.

Glucocorticosteroide werden an spezifische Rezeptorproteine im Zytoplasma gebunden. Der Hormon-Rezeptor-Komplex wandert in den Kern der Zelle und wird dort in das Chromatin inkorporiert. Durch diese Bindung wird die Transskriptionsrate bestimmter Gene gesteigert, so daß über eine erhöhte Bildung von m-RNA die Produktion verschiedener Proteine ansteigt. Der Hormon-Rezeptor-Komplex wirkt dabei selbst als induzierendes Agens (Karlson 1974; Lehninger 1977; Forth et al. 1987). Für viele Zellen sind deshalb Zusätze von Corticoiden zum Kulturmedium notwendig (Castell et al. 1983; Ham 1983; Jung-Testas und Baulieu 1983; Maurer 1986). Auch das Wachstum von Plasmodium falciparum-Gametocyten in vitro konnte durch Corticosteroide stimuliert werden (Maswoswe et al. 1985). Lymphatische Gewebe werden hingegen durch Glucocorticosteroide gehemmt. Dabei kann sowohl die Proliferation wie auch die Produktion von Mediatoren oder die spontane Zytotoxizität der T-Lymphozyten supprimiert sein. Darauf beruht die große therapeutische Bedeutung als Antiphlogistika (Forth et al. 1987).

Auch T. annulata-befallene Lymphozyten wurden in ihrer Proliferation durch die synthetischen Glucocorticosteroide Dexamethason und Prednisolon gehemmt. Darüber hinaus setzte aber auch eine Lyse der Wirtszellpopulation ein (Abb. 15C). Die ultrastrukturell erkennbaren Schädigungen der Parasiten (Abb. 16A) deuteten sich bereits bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen an. So waren sowohl der prozentuale Anteil infizierter Zellen wie auch die Anzahl der Schizontenkerne pro Wirtszelle reduziert (Abb. 15A,B). Auch wenn diese Ergebnisse sich statistisch nicht absichern ließen, fanden sie ihre Bestätigung durch die elektronenmikroskopisch beobachteten Schädigungen der Schizonten. Auffallend waren auch die ultrastrukturell erkennbaren Schädigungen der Wirtszellen, bis hin zur Lyse, die stark an die Wirkung ionisierender Strahlen auf Lymphozyten erinnerte. Die Kernstruktur war zerstört (Tafel 8), das Heterochromatin verklumpt und die Kernhülle aufgelöst.

Diese Ergebnisse entsprechen recht gut denen bei Cortisol-behandelten Lymphozyten. Auch hier war die Kernstruktur zerstört und die hochkondensierte DNA-Protein-Struktur disaggregiert (Elves 1966; Whitfield et al. 1968).

Alle Versuche mit Substanzen, die auf die Wirtszellen inhibierend wirkten, führten also nicht zu einer Induktion der Merozoitenbildung in vitro. Auch in den Fällen (Colchicin, Taxol), wo ein Anstieg der Schizontenkernzahl pro Wirtszelle erreicht werden konnte, waren die Wirkungen auf die Lymphoblasten und/oder die Parasiten so stark, daß die Teilung der Parasiten nicht über mehrere Tage erhalten werden konnte. Eine kritische Anzahl Schizontenkern pro Zelle bzw. eine durch andere Auslöser induzierte Merozoitenbildung konnte also unter diesen Bedingungen in vitro nicht auftreten.

Temperaturabhängige Induktion der Merozoitenbildung

Für die weiteren Experimente wurde versucht, den Verlauf der Infektion in vivo besser zu simulieren. Dazu wurde zunächst die Temperatur von 37 °C, wie es für die Schizontenkulturen optimal ist, auf 41 °C erhöht. Solche erhöhten Körpertemperaturen treten bei infizierten Rindern im Verlauf der Erkrankung nach wenigen Tagen auf (s. 2.1.). Zusätzlich wurden die Zellen in einer 5 % Kohlendioxid-Atmosphäre gehalten und das RPMI Vollmedium täglich erneuert.

Das Wachstum der Zellen war offensichtlich durch diese Änderungen der Kulturbedingungen nicht beeinträchtigt (Tab. 9). Im Gegensatz dazu beobachteten andere Autoren bei Lymphozyten, die mit T. parva infiziert waren, eine Abnahme der Teilungsrates der Wirtszellen bei Temperaturen zwischen 41 und 42 °C (Hulliger et al. 1966). Die im Verlauf der letzten Jahre verbesserten Zellkulturtechniken und die Tatsache, daß T. annulata-befallene Wirtszellen in vitro besseres Wachstum zeigen als T. parva-

Wirtslymphozyten, könnten die Ursache sein, daß T. annulata-Wirtszellen die erhöhte Temperatur besser tolerierten und über etwa 12 Tage unveränderte Teilungsraten aufwiesen. Ab dem zweiten Tag konnte dann auch ein Anstieg der Schizontenkernzahl pro Zelle festgestellt werden. Der Anstieg setzte sich bis zum neunten Tag fort (Abb. 18). Ab diesem Zeitpunkt kam es offenbar zu einem vermehrten Zerfall der mit reifen Merozoiten angefüllten Wirtszellen, wobei die gebildeten Merozoiten freigesetzt wurden. Gleichzeitig hatte die Neubildung von Merozoiten das Maximum überschritten, so daß es zu einer Abnahme der Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle kam. Aber auch am 15. Tag nach Versuchsbeginn konnten noch Neubildungen festgestellt werden.

Die Freisetzung von reifen Merozoiten geschah offensichtlich nicht synchron. Der zeitliche Verlauf der Entwicklung stimmte aber recht gut mit den in vivo beobachteten Ergebnissen überein, wo etwa ab dem 8. Tag nach Infektion Merozoiten in den Ausstrichen gefunden werden können (Mehlhorn und Schein 1984). Auch Hulliger und Mitarbeiter fanden bei ihren Experimenten mit T. parva nach 6 bzw. 9 Tagen bei 41 - 42 °C Merozoitenbildung (Hulliger et al. 1966). Sie beobachteten, daß 28 - 36 % der parasitierten Zellen Merozoiten enthielten. Ähnlich hohe Ergebnisse konnten bei T. annulata in vitro nicht gefunden werden (Abb. 19). Dafür konnte hierbei aber eine Merozoitenbildung über einen wesentlich längeren Zeitraum beobachtet werden.

Danskin und Wilde (1976) sowie Nyindo et al. (1978) fanden ebenfalls Merozoitenbildung bei T. parva in vitro. Nyindo et al. (1978) berichteten, daß sie Merozoitenbildung ab dem dritten Tag bei 22 °C festgestellt hatten, während Danskin und Wilde (1976) bei 37 °C die Merozoitenbildung durch Zugabe von 5 - 10 % Rinderlymphe induzieren konnten. Wie durch die erhöhten Temperaturen die Bildung von Merozoiten ausgelöst wurde, konnte nicht geklärt werden. Eine Verhinderung der Teilung der Wirtszellen, wie Hulliger et

al. (1966) es für ihre T. parva-Experimente als Erklärung heranziehen, kommt hierbei nicht in Frage. Andererseits sind eine Vielzahl biologischer Prozesse temperaturgeregelt, und auch von Protozoen sind Entwicklungsprozesse bekannt, die offenbar durch Temperaturänderungen ausgelöst werden (Hulliger et al. 1966).

Auffallend bei den Experimenten mit T. annulata war der Einfluß des Alters einer Kultur. Während bei Schizontenkulturen, die bei 37 °C gezüchtet wurden, auch nach 100 Passagen keine Veränderungen der Kulturparameter festgestellt werden konnten (s. 4.1.), zeigten sich deutliche Beeinträchtigungen der Merozoitenbildung bei älteren Kulturen (Abb. 20). So sank die durchschnittliche Anzahl Parasitenkerne pro Wirtszelle, bei Zellen die sieben Tage bei 41 °C gehalten wurden, nach der 40. Passage ab.

Auch der Anteil merozoitenbildender Schizonten verringerte sich mit zunehmendem Alter der Kulturen (Abb. 20). Das bestätigt die Beobachtungen, daß die Infektiösität von T. annulata nach längerer in vitro Züchtung abnimmt, weshalb diese attenuierten Schizontenkulturen auch für Immunisierungen verwendet werden können (Tsur et al. 1964; Pipano und Tsur 1966; Pipano 1979).

Keine Unterschiede hingegen traten bei T. annulata-Kulturen auf, die in flüssigem Stickstoff gelagert worden waren. Die Werte bewegten sich im Bereich der Kontrollen (Abb. 22). Erst nach 70 Passagen trat nach Kryokonserverierung keine Merozoitenbildung mehr auf. Die für die Rinderlymphozyten mit Schizonten verwendete Kryokonserverierungsmethode scheint also die Fähigkeit zur Merozoitenbildung nicht zu beeinträchtigen. Andererseits verliert sich die Fähigkeit durch lange in vitro Haltung. Neben speziellen Kulturbedingungen ist also die Verwendung junger Kulturen eine entscheidende Voraussetzung für eine regelmäßige Merozoitenbildung von T. annulata in vitro.

Ultrastrukturell zeigte die Merozoitenbildung in vitro keine Unterschiede zu in vivo Infektionen (s. auch

Schein et al. 1978). So konnten beide in vivo auftretenden Typen der Merozoitenbildung auch in vitro gefunden werden (Abb. 21, 23 und 24). Dabei schien der Typ II bevorzugt aufzutreten (Abb. 23). Auf diese Weise entstehen auch die Sporozoiten von Theileria in den Zellen der Speicheldrüsen ihrer Vektoren (Abb. 1; Mehlhorn et al. 1978). Auch die reifen Merozoiten wiesen die von in vivo Infektionen her bekannte Morphologie mit typischen Merkmalen wie Pellikula, Rhoptrien und Polringsystem auf (Abb. 21, 23 und 24). Ein morphologischer Vergleich mit in vitro gebildeten Merozoiten von T. parva ist kaum möglich, da entweder keine elektronenmikroskopischen Aufnahmen vorliegen oder die Aufnahmen keine eindeutigen Merozoitenmerkmale erkennen lassen (Nyindo et al. 1978).

Bildung intraerythrozytärer Stadien in vitro

Daß es sich bei den in vitro gebildeten Merozoiten um ausgereifte, motile und infektiöse Formen handelte, konnte durch die Zugabe von Rinderblut nachgewiesen werden. In diesen Versuchen fanden sich nämlich nach 2 h erste intraerythrozytäre Stadien. Die Maximalwerte wurden nach 3 bis 4 Tagen beobachtet (Abb. 25). Entscheidend für einen Befall von Erythrozyten waren die Kulturbedingungen. So war eine wesentliche Voraussetzung die Änderung der Zusammensetzung der Atmosphäre, mit einem erhöhten Anteil von Kohlendioxid. Dabei reichte ein Anteil von 5 % CO₂ in der Luft für die Bildung von intraerythrozytären Stadien aus. Allerdings konnte der Anteil infizierter Erythrozyten durch die candle jar Methode verdoppelt werden. Diese von Jensen und Trager (1977) für erythrozytäre Stadien von Plasmodium falciparum entwickelte Methode erzielt neben einem etwa 3 %igen Kohlendioxidanteil eine Verringerung des Sauerstoffgehaltes auf etwa 14 - 17 % (Trager und Jensen 1980). Daneben erwies sich aber auch eine weiterhin auf 41 °C erhöhte Temperatur, wie sie auch in vivo auftritt, als erforderlich.

Nur wenige befallene Erythrozyten konnten bei der Verwendung von gereinigten Erythrozyten beobachtet werden. Vollblut hingegen bot günstigere Voraussetzungen. Möglicherweise war das Vollblut durch seinen Serumanteil begünstigt, weil dadurch auch der Serumanteil im Kulturmedium anstieg (vgl. auch 4.6.2.).

Bei Versuchen mit T. parva wurden nur von Danskin und Wilde (1976) sowie Nyindo et al. (1978) die Bildung intraerythrozytärer Stadien beschrieben. Die Befallsraten waren sehr gering, so fanden Danskin und Wilde etwa 0,1 % befallene Erythrozyten nach 6 - 54 h in Ausstrichen. Nyindo und Mitarbeiter (1978) konnten lichtmikroskopisch keine befallenen Erythrozyten finden, zeigten aber elektronenmikroskopische Aufnahmen von in vitro infizierten Erythrozyten, die nach eigenen Angaben wenig entwickelte intraerythrozytäre Formen zeigen. Tatsächlich lassen sich auch keine eindeutigen Merkmale intraerythrozytärer Stadien von Theileria erkennen.

Die durch die T. annulata-Experimente erreichten Befallsraten von $0,7 \pm 0,4$ % liegen damit um etwa das 7fache über den von T. parva berichteten Ergebnissen. Daß intraerythrozytäre Stadien eindeutig und regelmäßig in den Versuchen mit T. annulata identifiziert werden konnten, war sicherlich auf die speziellen Kulturbedingungen zurückzuführen.

Ultrastrukturell zeigten die in vitro gebildeten intraerythrozytären Stadien von T. annulata keine Unterschiede zu in vivo gebildeten (vgl. auch Schein et al. 1977). Typische Strukturen wie Mikropore, doppelwandige Vakuole und gelegentlich Reste der Pellikula traten auf (Abb. 26). Auch intraerythrozytäre Teilungsstadien wurden gefunden (Abb. 4E und 26D). Es konnten aber immer nur Zweiteilungen gefunden werden. Vierfachteilungen, wie sie von Conrad und Koautoren (1985; 1986) beschrieben wurden, kamen hingegen nicht vor. Sie verwendeten jedoch in vivo Infektionen von T. annulata und T. parva, von denen sie, nach der Bildung intraerythrozytärer Stadien, die

Erythrozyten in Kultur nahmen. Die beschriebenen Vierfachteilungen beobachteten sie bei T. annulata in 20 - 60 % der befallenen Erythrozyten nach 6 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt hatte der Anteil in vitro gebildeter intraerythrozytärer Stadien bereits das Maximum überschritten (Abb. 25), und nur noch wenige befallene Erythrozyten konnten in den Kulturen gefunden werden. Auch andere Autoren fanden nur Zweiteilungen bei in vivo Infektionen von T. annulata (Schein et al. 1977), so daß die von Conrad et al. beobachteten Vierfachteilungen möglicherweise auf ihre speziellen Kulturbedingungen zurückgeführt werden können.

Beeinflussung der Merozoitenbildung und der Erythrozyteninfektion in vitro durch verschiedene Substanzen

Die meisten Substanzen, die sich in den Versuchen bei 37 °C als inhibierend erwiesen hatten (s. a. 4.3.1.), wirkten auch bei 41 °C so stark, daß die Teilung der Wirtszellen unterbunden wurde bzw. die Zellen lysiert waren. Auch die Parasiten wurden stark beeinträchtigt, so daß nur in einigen Fällen eine Merozoitenbildung in vitro beobachtet werden konnte (Tab. 11). Dazu gehörten niedrige Konzentrationen von Colchicin (0,001 µmol/l), Polyethylenglykol (1 %) und Taxol (0,1 bzw. 1 µmol/l). Bei diesen Substanzen konnte durch diese niedrigen Konzentrationen eine Merozoitenbildung nicht vollständig verhindert werden. Die erreichten Werte lagen aber nur bei 25 - 50 % der Kontrollwerte. In allen Versuchen, in denen Merozoitenbildung auftrat, konnten auch befallene Erythrozyten beobachtet werden. Bei den entstandenen Merozoiten handelte es sich also um ungeschädigte und reife Stadien.

Die arretierte Wirtszellmitose führte aber nicht zu einer Synchronisation der Merozoitenbildung. Die Entwicklung des Parasiten schien nicht an den Zellzyklus der Wirtszelle gebunden zu sein. Ähnliches beobachteten Hulliger und Mitarbeiter (1964). Sie fanden auch keine Synchronisierbarkeit der Merozoitenbildung in vitro durch

Colchicin. Offensichtlich war die Merozoitenbildung von T. annulata in vitro auch nicht von einer verhinderten Teilung der Wirtszellen abhängig, wie es von einigen Autoren für T. parva angenommen wurde (Hulliger et al. 1966).

Weil die Merozoitenbildung nicht synchronisierbar war, konnten mit den verwendeten Zellkulturtechniken keine großen Mengen von reifen, zellfreien Merozoiten induziert werden. Diese ließen sich aber eventuell über aufwendigere Massenkulturen, mit kontinuierlichem Medienaustausch und Anreicherung der zellfreien Stadien, erreichen. Ähnliche Methoden wurden bereits für Plasmodium-Kulturen entwickelt (Enders und Hermitin 1983; Enders 1988). Auch größere Mengen intraerythrozytärer Stadien ließen sich auf diese Weise sicherlich leichter erhalten.

Im Gegensatz zu Theileria liegen die intraerythrozytären Stadien von Plasmodium jedoch in einer parasitophoren Vakuole. Außerdem ist die Bildung und Freisetzung von Merozoiten nach einigen Tagen synchronisiert, was zu den typischen rhythmischen Fieberanfällen führt (Mehlhorn und Piekarski 1980). Wegen der Synchronität ist die Anreicherung einer größeren Anzahl Plasmodium-Merozoiten gegenüber den Verhältnissen bei Theileria begünstigt.

Optimierung des Mediums

Die Kulturbedingungen und die Zusammensetzung des Mediums hatten erhebliche Auswirkungen sowohl auf die Merozoitenbildung wie auch auf die Befallsrate der Erythrozyten in vitro (s. a. 4.4. und 4.5.). Darum wurde versucht, durch Optimierung des verwendeten Mediums eine höhere Ausbeute bei 41 °C zu erreichen.

Keine weitere Steigerung konnte durch die Mitogene Concanavalin A und Phytämagglutinin erzielt werden (Tab. 12). Diese unspezifischen Lektine zeigten keine stimulierende Wirkung auf Theileria-befallene Zellen (Frese 1983) und wirkten auch nicht auf die Parasiten selbst. Calcium-abhängige Prozesse schienen nicht weiter ge-

steigert werden zu können. Im Gegenteil, ein Ca^{2+} -Überangebot wirkte eher hemmend auf die Merozoitenbildung. Auch in Kombination mit dem Ca-Modulator Calmodulin konnten keine gesteigerten Effekte beobachtet werden (s. 4.6.3.). Zusätze von Kalium bewirkten zwar keine Verringerung der Merozoitenproduktion, zeigten aber auch keine fördernde Wirkung. Ebensowenig konnte durch Insulin, t-RNA und die meisten Aminosäuren eine gesteigerte Merozoitenbildung bewirkt werden.

Offensichtlich bewegten sich aber die Konzentrationen einiger wichtiger Stoffe, trotz täglichem Medienwechsel, dennoch an der unteren Grenze, denn durch Zugaben von Glucose, ATP, basischen Aminosäuren, Transferrin und Nucleinsäuren konnte eine Steigerung der Merozoitenbildung und des Befalls von Erythrozyten erreicht werden (Tab. 12). Besonders wirksam steigerte eine Verdoppelung des Anteils an fötalem Kälberserum die Merozoitenausbeute. Dabei wurde die maximale Wirkung schon mit 20 % FCS erreicht. Für stationäre Erythrozytenkulturen mit Piroplasmen aus in vivo Infektionen hingegen wurden Serumanteile von 40 % verwendet (Conrad et al. 1985).

Hier liegt sicherlich auch ein Grund, warum Vollblut, das ja Serum enthält, gegenüber gereinigten Erythrozyten die höheren Befallsraten aufwies.

Desweiteren führte auch das Tripeptid Glutathion zu gesteigerter Merozoitenproduktion. Die Hinzufügung der reduzierten Form könnte als Oxidationsschutz, entsprechend seinem Redoxpotential, für bestimmte Makromoleküle dienen. Aber auch beim Aminosäuretransport über den Glutaminsäurezyklus in die Zellen spielt es eine wesentliche Rolle. Weitere Funktionen in der Zelle sind weitgehend ungeklärt, obschon die relativ hohe Konzentration von 5 mmol/l in vielen tierischen Geweben auf essentielle Aufgaben hindeutet (Lehninger 1977).

Die in verschiedenen Kombinationen getesteten, die Merozoitenbildung und die Erythrozyteninfektion fördernden Substanzen, wiesen im allgemeinen keine additive Wirkung

auf (s. auch 4.6.3.).

So wurden zumeist die Werte der am stärksten wirkenden Einzelsubstanz nicht übertroffen. Eine relativ umfangreiche Ergänzung des Standard RPMI 1640 Vollmediums führte dennoch (O-RPMI; 4.6.3.) zu erhöhten Werten. Die hierdurch erreichten Maximalwerte der Merozoitenbildung von bis zu 7 % lagen zwar noch deutlich unter den von T. parva berichteten Werten von 28 - 36 % (Hulliger et al. 1966). Der Anteil befallener Erythrozyten konnte hingegen teilweise auf über 2 % gesteigert werden (Mittelwert $1,5 \pm 0,4$) und lag damit doppelt so hoch wie bei Verwendung des Standard-RPMI-Mediums. Die von T. parva in vitro bekannten Ergebnisse von etwa 0,1 % (Danskin und Wild 1976) wurden somit um das 15 - 20fache übertroffen. Essentiell für die Induktion der Merozoiten war aber auf jeden Fall die Erhöhung der Temperatur auf 41 °C. Bei 37 °C trat auch bei Verwendung des O-RPMI Mediums keine Merozoitenbildung auf.

Trotz der verbesserten Bedingungen blieb aber die Merozoitenausbeute und die Ausbeute intraerythrozytärer Stadien so gering, daß für eine Anreicherung und Isolierung der entsprechenden Stadien diese Zellkulturmethoden auf Massenkulturen mit kontinuierlichem Mediumaustausch und mit kontinuierlicher Aberntung von freien Merozoiten und von parasitierten Erythrozyten ausgelegt werden müssen. Daß gute Möglichkeiten für eine Ausweitung dieser Techniken bestehen, zeigen weiterentwickelte Zellkulturmethoden, wie sie z.B. für erythrozytäre Stadien von verschiedenen Plasmodium-Arten verwendet werden (Trager und Jensen 1976; Enders et al. 1977; Jensen 1978; Scheibel et al. 1979; Enders 1988).

Die hier dargestellten Experimente zeigten, daß die Weiterentwicklung von T. annulata in vitro induziert werden konnte. Alle in den Wirbeltierwirten vorkommenden Stadien konnten in vitro induziert und gezüchtet werden. Nach Entwicklung geeigneter Methoden bietet sich damit

vielleicht die Möglichkeit, in vitro produzierte intraerythrozytäre Stadien auf Vektoren zu übertragen. Damit könnte der vollständige Lebenszyklus dieser Parasiten im Labor für Experimente gehalten werden, ohne daß Wirbeltiere involviert wären.

Wenn durch die Verwendung von Massenkulturen oder geeigneten hochspezifischen Anreicherungsverfahren größere Mengen in vitro gebildeter Merozoiten erhalten werden können, bietet dies neue Ansatzmöglichkeiten für Immunisierungsversuche (s. auch 2.5.). Eine wirksame Vakzinierung gegen dieses Stadium würde die Weitergabe der Erkrankung unterbinden und könnte in Kombination mit Sporozoiten- und Schizontenvakzinen einen umfassenden und wirkungsvollen Schutz gegen diese einzelligen Parasiten bewirken. Wesentliche Voraussetzung war der Nachweis, daß die Bildung reifer und infektiöser Merozoiten in vitro induzierbar ist.

6. Abkürzungsverzeichnis

AL	= Annulate Lamelle
ATP	= Adenosintriphosphat
CH	= Heterochromatin
CM	= Zellmembran
CR	= Chromosomen
CY	= Zytoplasma
DMSO	= Dimethylsulfoxid
DNA	= Desoxyribonucleinsäure
DS	= Erythrozytäres Stadium in Teilung
DSW	= durchschnittliche Anzahl Schizontenkerne pro Wirtszelle (s. 3.6.)
E	= Erythrozyte
EC	= Euchromatin
EDTA	= Ethyldiamintetraacetat
EM	= Elektronenmikroskop(ische)
EP	= Erythrozytenplasma
ER	= Endoplasmatisches Reticulum
ERL	= Epoxy resin of low viscosity
ES	= Erythrozytäres Stadium
FCS	= fötales Kälberserum
GA	= Golgi Apparat
HC	= Wirtszelle
HEPES	= 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HM	= Wirtszell-Mitochondrium
LM	= Lichtmikroskop(isch)
LY	= Lymphozyte
MA	= Merozoiten-Anlage
ME	= Merozoit
MI	= Mitochondrium
Mi	= Mitoseindex (s. 3.6.)
MN	= Kern des Merozoiten
MP	= Mikropore
MT	= Mikrotubulus/i

N	= Kern
NCS	= Serum von neugeborenen Kälbern
NE	= Kernhülle
NH	= Kern der Wirtszelle
NU	= Nukleolus
OM	= Ovolder erythrozytärer Merozoit
O-RPMI	= Optimiertes RPMI Medium (s. 4.6.3.)
P	= Polringsystem
PBS	= Phosphat gepufferte Salzlösung (s. 3.5.)
PE	= Pellikula
PEG	= Polyethylenglykol
PIZ	= prozentualer Anteil <u>Theileria</u> -infizierter Zellen
PR	= Polyribosomen
R	= Rhoptrie
RB	= Restkörper
RI	= Ribosomen
RNA	= Ribonucleinsäure
RPMI	= Rosewell Park Memorial Institute
S	= Schizont
SM	= Mitochondrium des Schizonten
SN	= Kern des Schizonten
SPO	= Sporont
t-RNA	= Transfer-Ribonucleinsäure
V	= Vakuole

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD
(1983) Molecular biology of the cell. Garland Publishing
New York London
- Barnett SF (1977) Theileria. In: Kreier JP (Hrsg.)
Parasitic protozoa. Vol. 4 Academic Press New York
London, S. 77-113
- Baum SG, Wittner M, Nadler JP, Horwitz SB, Dennis JE,
Schiff PB, Tanowitz HB (1981) Taxol a microtubule
stabilizing agent, blocks the replication of
Trypanosoma cruzi. Proc Natl Acad Sci USA 78:
4571-4578
- Bell LJ (1984) Tick tissue culture techniques in the
study of arthropod-borne protozoa: The development of
Theileria annulata in organ cultures of Hyalomma
anatolicum anatolicum. In: Griffiths DA, Bowman
CE (Hrsg.) Acarology VI Vol. 2 Ellis Horwood,
Chichester:1089-1095
- Bjare U (1987) Serum-free cultivation of lymphoid cells.
Adv Biochem Engineering/Biotech 34:95-109
- Boyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and
granulocytes from human blood. Scand J Clin Invest 21
(Suppl 97):77-89
- Brocklesby DW, Hawking F (1958) Growth of Theileria
annulata and Theileria parva in tissue culture.
Trans R Soc Trop Med Hyg 52:414-420
- Brown CGD (1979) Propagation of Theileria. In:
Maramorosch K, Hirumi H (Hrsg.) Practical tissue
culture applications. Academic Press New York London:
223-254
- Brown CGD (1983) Theileria. In: Jensen JB (Hrsg.)
In vitro cultivation of protozoan parasites. CRC Press
Boca Raton, Florida:243-284

- Brown CGD (1987) Theileriidae. In: Taylor AER, Baker JR (Hrsg.) In vitro methods for parasite cultivation. Academic Press New York, London:230-253
- Brown CGD, Stagg DA, Purnell RE, Kanhai GK, Payne RC (1973) Infection and transformation of bovine lymphoid cells in vitro by infective particles of Theileria parva. Nature 245:101-103
- Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Coloma J (1983) Preservation of adult functionality of hepatocytes in serum free cultures. In: Fischer G, Wieser RJ (Hrsg.) Hormonally defined media. Springer, Berlin Heidelberg New York: 333-336
- Conrad PA, Kelly BG, Brown CGD (1985) Intraerythrocytic schizogony of Theileria annulata. Parasitology 91:67-82
- Conrad PA, Denham D, Brown CGD (1986) Intraerythrocytic multiplication of Theileria parva in vitro: an ultrastructural study. Int J Parasitol 16:223-229
- Cunningham MP, Brown CGD, Purnell RE, Branagan D (1971) The preservation at low temperature of infected particles of Theileria parva. J Parasitol 57:60
- Cunningham MP, Brown CGD, Burridge MJ, Purnell RE (1974) Cryopreservation of infective particles of Theileria parva. Int J Parasitol 3:583-587
- Danskin D, Wilde JKH (1976) Simulation in vitro of bovine host cycle of Theileria parva. Nature 261:311-312
- Daub AM, Hauser M (1988) Taxol affects meiotic spindle function in locust spermatocytes. Protoplasma 142:147-155
- DeBrabander M, Geunens G, Nuydens R, Willebrords R, DeMey J (1981) Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. Proc Natl Acad Sci USA 78: 5608-5612
- Dobbelaere DAE, Coquerelle TM, Roditi IJ, Eichhorn M, Williams RO (1988) Theileria parva infection induces autocrine growth of bovine lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 85:4730-4734

- Dolan TT (1986) Chemotherapy of East Coast fever.
Acta Trop 43:165-173
- Dolan TT (1987) Immunization to control East Coast fever
Parasitol Today 3:4-6
- Dolan TT, Young AS, Leitch BL, Stagg DA (1984) Chemotherapy
of East Coast fever: parvaquone treatment of clinical di-
sease induced by isolates of Theileria parva.
Vet Parasitol 15:103-116
- Dollenmeier P, Eppenberger HM (1983) Differentiation of
primary muscle cells cultured in a serum free chemically
defined medium. In: Fischer G, Wieser RJ (Hrsg.)
Hormonally defined media. Springer, Berlin Heidelberg
New York:358-365
- Dyer M, Tait A (1987) Control of lymphoproliferation by
Theileria annulata. Parasitol Today 3:309-311
- Elves MW (1966) The lymphocytes. Lloyd Luke London
- Enders B (1988) In vitro cultivation of certain parasitic
protozoa. In: Mehlhorn H (Hrsg.) Parasitology in focus.
Facts and trends. Springer, Berlin Heidelberg New York:
702-718
- Enders B, Hermentin P (1983) Neuere Perspektiven bei der
Entwicklung eines Malaria-Impfstoffes. Forum Mikrobiol
6:10-19
- Enders B, Brauns F, Zwisler O (1977) Biochemical and tech-
nical considerations regarding the mass production of
certain parasitic protozoa. Bull WHO 55:393-402
- Fitzgerald PH, Brehaut LA (1970) Depression of synthesis
and mitotic index by colchicine in cultured human
lymphocytes. Exp Cell Res 59:27-31
- Frese K (1983) In vitro Untersuchungen zur Stimulation
immunkompetenter Lymphozyten bei der Theileria
annulata Infektion der Rinder. Diss FU Berlin 79 S.
- Fritsch FM, Mehlhorn H, Schein E, Hauser M (1988) The
effects of drugs on the formation of Theileria
annulata merozoites in vitro. Parasitol Res 74:
340-343

- Forth W, Henschler D, Rummel W (1987) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 5. Auflage Bibliographisches Institut & Brockhaus AG, Mannheim Wien Zürich
- Ham RG (1983) Growth of normal human cells in defined media. In: Fischer G, Wieser RJ (Hrsg.) Hormonally defined media. Springer, Berlin Heidelberg New York:16-30
- Hashemi-Fersharki R, Shad-Del F (1973) Vaccination of calves and milking cows with different strains of Theileria annulata. Am J Vet Res 34:1465-1473
- Hauser M (1986) Taxol affects both the microtubular arrays of heliozoan axonemes and their microtubule-organizing center. Eur J Cell Biol 42:295-304
- Hausmann K, Linnenbach M, Patterson DJ (1983) The effects of taxol on microtubular arrays: In vivo effects of heliozoan axonemes. J Ultrastruct Res 82:212-220
- Hell E, Cox DG (1963) Effects of colchicine and colcemid on synthesis of desoxyribonucleic acid in the skin of guinea pig's ear in vitro. Nature 19:287-288
- Hooshmand-Rad P (1975) The growth of Theileria annulata infected cells in suspension culture. Trop Animal Hlth Prod 7:23-28
- Hulliger L (1965) Cultivation of three species of Theileria in lymphoid cells in vitro. J Protozool 12:649-655
- Hulliger L, Wilde JKH, Brown CGD, Turner L (1964) Mode of multiplication of Theileria in cultures of bovine lymphocytic cells. Nature 203:728-730
- Hulliger L, Brown CGD, Wilde JKH (1966) Transition of developmental stages of Theileria parva in vitro at high temperatures. Nature 211:328-329
- Igarashi I, Taguchi M, Suzuki N (1979) Fundamental studies on macrophage migration inhibitory factors in the supernatant from spleen cells in mice infected with Toxoplasma gondii. Zentralbl Bakteriol Orig A 244:374-382
- Irvin AD (1985) Immunity in theileriosis. Parasitol Today 5:124-128

- Irvin AD, Young AS (1980) The biology of Theileria parva and East Coast fever in cattle. In: Rowe DS, Hirumi H (Hrsg.) The in vitro cultivation of pathogens of tropical diseases. Schwabe & Co, Basel:111-126
- James ER (1988) Cryopreservation of parasites. In: Mehlhorn H (Hrsg.) Parasitology in focus. Facts and Trends. Springer, Berlin Heidelberg New York:684-701
- Jensen JB (1978) Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of Plasmodium falciparum. Am J Trop Med Hyg 27:1274-1276
- Jensen JB, Trager W (1977) Plasmodium falciparum in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. J Paraitol 63:883-886
- Juliano C, Monaco G, Rubino S, Cappuccinelli P (1986) Inhibition of Trichomonas vaginalis replication by the microtubule stabilizer taxol. J Protozool 33:255-260
- Jung-Testas I, Baulieu EE (1983) Growth regulation of L-929 mouse fibroblasts by steroid hormones and antihormones in serum containing and serum free media. In: Fischer G, Wieser RJ (Hrsg.) Hormonally defined media. Springer Berlin Heidelberg New York: 114-119
- Kaighn ME (1983) Human prostatic cells in serum-free medium. In: Fischer G, Wieser RJ (Hrsg.) Hormonally defined media. Springer, Berlin Heidelberg New York: 418-429
- Karlson P (1974) Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Thieme, Stuttgart
- Kemp SJ, Teale AJ (1984) Cryopreservation of lymphocytes in whole cattle blood: a method suited to the field collection of large numbers of samples. Animal Blood Groups and Biochem Gen 15:219-222
- Klee CB, Couch TH, Richman PG (1980) Calmodulin. Annu Rev Biochem 49:489-515
- Knight SC (1980) Preservation of leucocytes. In: Ashwood-Smith MJ, Farrant J (Hrsg.) Low temperature preservation in medicine and biology. Pitman Medical Tunbridge Wells, Kent:121-138

- Lehninger AL (1977) Biochemie, 2. Auflage Verlag Chemie, Weinheim
- Levine ND (1973) Protozoan parasites of domestic animals and of man. 2. Auflage Burgess Publishing, Minneapolis
- Lindel T, Bauer J (1987) Zell- und Gewebekultur. Fischer, Stuttgart
- Malmquist WA, Nyindo MBA, Brown CGD (1970) East Coast fever: cultivation in vitro of bovine spleen cell lines infected and transformed by Theileria parva. Trop Anim Hlth Prod 2:139-145
- Maswoswe SM, Peters W, Warhurst DC (1985) Corticosteroid stimulation of the growth of Plasmodium falciparum gametocytes in vitro. Ann Trop Med Parasitol 79:607-616
- Maurer HR (1986) Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. In: Freshney RI (Hrsg) Animal cell culture, a practical approach. IRL Press Oxford pp 13-32
- McHardy N, Morgan DWT (1985) Treatment of Theileria annulata infection in calves with parvaquone. Res Vet Sci 39:1-4
- McHardy N, Haigh AJB, Dolan TT (1976) Chemotherapy of Theileria parva infection. Nature 261:698-699
- McHardy N, Wekesa L, Hudson A, Randall A (1985) Anti-theilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone. Res Vet Sci 39:29-33
- Means AR, Dedman JR (1980) Calmodulin - an intracellular calcium receptor. Nature 285:73-77
- Mehlhorn H (1988) Life cycles. In: Mehlhorn H (Hrsg.) Parasitology in focus. Facts and Trends. Springer, Berlin Heidelberg New York:1-148
- Mehlhorn H, Piekarski G (1980) Grundriß der Parasitenkunde. G. Fischer, Stuttgart
- Mehlhorn H, Schein E (1984) The piroplasms: life cycle and sexual stages. Adv Parasitol 23:37-103

- Mehlhorn H, Schein E, Warnecke M (1978) Electron microscopic studies on the development of kinetes of Theileria parva in the gut of the vector tick Rhipicephalus appendiculatus. Acta Trop 35:123-136
- Mehlhorn H, Moltmann U, Schein E, Voigt WP (1981) Electron microscopical study on the effect of halofuginone on Theileria parva. Trop Med Parasit 32:231-233
- Meryman HT, Weinman D (1968) Cryopreservation. In: Weinman D, Ristic M (Hrsg.) Infectious blood diseases of man and animals. Academic Press, New York:243-265
- Moore GE, Gerner RE, Franklin HA (1967) Culture of normal human leukocytes. JAMA 199:519-525
- Morrison WI, Lalor PA, Goddeeris BM, Teale AJ (1986) Theileriosis: antigens and host-parasite interactions. In: Pearson TW Parasite antigens: towards new strategies for vaccines. Marcel Dekker, New York: 167-212
- Musisi FL, Bird RG, Brown CGD, Smith M (1981) The fine structural relationships between Theileria schizonts and infected bovine lymphoblasts from culture. Z Parasitenkd 65:31-41
- Neitz WO (1953) Aureomycin in Theileria parva infections. Nature 171:34-35
- Nyindo MBA, Kaminjolo JS, Wagner GG, Lule M (1978) East Coast fever: cultivation in vitro of cell-free schizonts and merozoites of Theileria parva and their immunogenicity in cattle. Am J Vet Res 39:37-44
- Ogawa R, Sato M, Hirose T, Suzuki N (1985) Preventive effect of Toxoplasma Lysate Antigen (TLA) on fatal infection with mouse piroplasma. Jpn J Vet Sci 47: 225-236
- Oliver RA, Springbett AJ, Spooner RL (1984) A method for freezing bovine lymphocytes. Animal Blood Groups and Biochem Gen 15:213-217.
- Omata Y, Nakabayashi T, Suzuki N (1979) Different appearance of parasitized erythrocytes in blood between normal and Toxoplasma-infected rats after infection of Plasmodium berghei. Zentralbl Bakteriол Orig A: 362-373

- Omata Y, Ishimine T, Nakabayashi T, Suzuki N (1980) Studies on protective reaction against Plasmodium berghei in rat neonates. Jpn J Parasitol 30:281-288
- Omata Y, Yagami K, Takei, Suzuki N, Nakabayashi T (1981) Protective reaction against malaria infection in mice sensitized with frozen-thawed Toxoplasma tachyzoites Zentralbl Bakteriол Orig A 250:223-235
- Osaki H, Furuya M, Nagasawa H, Suzuki N (1984) Antimicrobial activity of obioactin. Zentralbl Bakteriол Orig A 256:328-334
- Parness J, Horwitz SB (1981) Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. J Cell Biol 91:479-487
- Pinder M, Kar S, Withey KS, Lundin LB, Roelants GE (1981) Proliferation and lymphocyte stimulatory capacity of Theileria-infected lymphoblastoid cells before and after the elimination of intracellular parasites. Immunology 44:51-60
- Pipano E (1979) Virulence and immunity of cultured Theileria annulata schizonts. J S Afr Vet Assoc 50:332-341
- Pipano E (1981) Schizonts and tick stages in immunization against Theileria annulata infection. In: Irvin AD, Cunningham MP, Young AS (Hrsg.) Advances in the control of theileriosis. Martinus Nijhoff, Den Haag: 242-252
- Pipano E, Tsur I (1966) Experimental Immunization against Theileria annulata with a tissue culture vaccine. I. Laboratory trials. Refuah Vet 23:186-194
- Raether W (1988) Chemotherapy and other control measures of parasitic diseases in domestic animals and man. In: Mehlhorn H (Hrsg.) Parasitology in focus. Facts and Trends. Springer, Berlin Heidelberg New York:739-866
- Romeis B (1968) Mikroskopische Technik. Oldenbourg Verlag München

- Samish M, Pipano E (1978) Transmission of Theileria annulata by two and three host ticks of the genus Hyalomma (Ixodidae). In: Wilde JKH (Hrsg.) Tick-borne diseases and their vectors, Univ Edinburgh
- Scheibel LW, Ashton SH, Trager W (1979) Plasmodium falciparum - microaerophilic requirements in human red blood cells. Exp Parasitol 47:410-418
- Schein E (1976) Zum Entwicklungszklus von Theileria annulata (Dschunkowsky und Luhs, 1904) in der Überträgerzecke Hyalomma anatolicum excavatum (Koch, 1844). Habilitations Schrift, FU Berlin
- Schein E, Voigt WP (1979) Chemotherapy of bovine theileriosis with halofuginone. Acta Trop 36:391-394
- Schein E, Voigt WP (1981) Chemotherapy of theileriosis in cattle. In: Irvin AD, Cunningham MP, Young AS (Hrsg.) Advances in the control of theileriosis. Martinus Nijhoff Den Haag: 212-214
- Schein E, Büscher G, Friedhoff KT (1975) Licht-mikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung von Theileria annulata (Dschunkowsky und Luhs 1904) in Hyalomma anatolicum excavatum (Koch 1844). Z Parasitenkd 48:123-136
- Schein E, Mehlhorn H, Warnecke M (1977) Zur Feinstruktur der erythrozytären Stadien von Theileria annulata (Dschunkowsky, Luhs 1904). Tropenmed Parasit 28:349-360
- Schein E, Mehlhorn H, Warnecke M (1978) Electron microscopic studies on the schizogony of four Theileria species of cattle (T. parva, T. lawrencei, T. annulata, T. mutans). Protistologica 14:337-348
- Schiff PB, Horwitz SB (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. Proc Natl Acad Sci USA 77: 1561-1565
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. Nature 277:665-667
- Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J Ultrastruc Res 26: 31-43

- Stagg DA, Chasey D, Young AS, Morzaria SP, Dolan TT (1980) Synchronization of the division of Theileria macro-schizonts and their mammalian host cells. Ann Trop Med Parasitol 74:263-265
- Suzuki N, Espinas FM, Sakurai H, Saito A, Sasaki H, Kato G, Manaba K, Taniguchi K, Mochizuki K, Osaki H (1984a) Studies on the activity of obioactin with acetylspiramycin on mice infected with Toxoplasma gondii. Zentralbl Bakteriол Orig A 256: 367-380
- Suzuki N, Izumo A, Sakurai H, Saito A, Miura H, Osaki H (1984b) Toxoplasmaicidal activity of Obioactin derived from hydrolyzed Toxoplasma immune bovine serum in heterologous cell cultures. Zentralbl Bakteriол Orig A 256:356-366
- Suzuki N, Kikushima K, Miyagami T, Igarashi I, Sakurai H, Saito A, Osaki H (1987) Modulator effects of Toxoplasma lysate antigen in mice experimentally infected with Plasmodium berghei. Zentralbl Bakteriол Orig A 264:422-434
- Tatchell RJ (1987) Tick control in the context of East Coast fever immunization. Parasitol Today 3:7-10
- Trager W, Jensen JB (1976) Human malaria parasites in continuous culture. Science 193:673-675
- Trager W, Jensen JB (1980) Cultivation of erythrocytic and exoerythrocytic stages of Plasmodia. In: Kreier JP, (Hrsg.) Malaria Vol 2. Academic Press New York:271-319
- Trowell OA (1960) The cytotoxic action of mitotic poisons on lymphocytes in vitro. Biochem Pharmacol 5:53-63
- Tsur I (1945) Multiplication in vitro of Koch bodies of Theileria annulata. Nature 156:391
- Tsur I, Adler S (1962) Cultivation of Theileria annulata schizonts in monolayer tissue culture. Refuah Vet 19:224-225
- Tsur I, Adler S (1965) The cultivation of lymphoid cells and Theileria annulata schizonts from infected bovine blood. Refuah Vet 22:60-62

- Tsur I, Adler S, Pipano E, Senft Z (1964) Continuous growth of Theileria annulata schizonts in monolayer tissue cultures. Proc 1st Int Congr Parasitol, Rome 1:266
- Uilenberg G (1980) Chemotherapy of bovine theileriosis with halofuginone. In: Proc 3rd European Multicolloquium on Parasitology, Cambridge
- Uilenberg G (1981) Theileria species of domestic livestock. In: Irvin AD, Cunningham MP, Young AS (Hrsg.) Advances in the control of theileriosis. Martinus Nijhoff, Den Haag: 4-37
- Uilenberg G, Silayo RS, Mpangala C, Tondeur W, Tatchell RJ, Sanga HJN (1977) Studies on Theileriidae (Sporozoa) in Tanzania. X. A large scale field trial on immunization against cattle theileriosis. Tropenmed Parasitol 28: 499-506
- Venable JH, Coggeshall R (1965) A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J Cell Biol 25: 407-408
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. J Am Chem Soc 93:2325-2327
- Wathanga JM, Jones TW, Brown CGD (1986) Cryopreservation of Theileria-infected lymphoblastoid cells with functional assesment of viability. Trop Anim Hlth Prod 18:191-197
- White DL, Mazurkiewicz JE, Barrnett RJ (1979) A chemical mechanism for tissue staining by osmium tetroxid-ferrocyanide mixtures. J Histochem Cytochem 27:1084-1091
- Whitfield JF, Perris AD, Youdale T (1968) Destruction of the nuclear morphology of the thymic lymphocytes by the corticosteroid cortisol. Exp Cell Res 52:349-362
- Wilde JKH (1967) East Coast fever. Adv Vet Sci 11:207-259

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. H. Mehlhorn danke ich für die Vergabe des Themas, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und die hilfreichen Anregungen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. E. Schein, FU Berlin, danke ich für die freundliche Überlassung von Sporozoiten und Zellkulturen sowie für die Hinweise und Hilfen bei der Infektion der Zellen.

Herrn Prof. Dr. M. Hauser, Ruhr-Universität Bochum, danke ich für Anregungen und die Hinweise auf Taxol.

Für die Überlassung von Obioactin und Toxoplasma-Lysat-Antigen danke ich Prof. Dr. N. Suzuki, Obihiro, Japan.

Für das zur Verfügung gestellte Taxol danke ich Dr. Suffness, NIH, Bethesda, Md, USA.

Frau Dr. U. Mackenstedt danke ich für die Einführung in die Elektronenmikroskopie und die fortwährende kollegiale Zusammenarbeit.

LEBENS LAUF

geboren : 4.4. 1959 in Köln; Deutscher; verheiratet;
ein Kind

Vater : Hans Fritsch, Industriekaufmann

Mutter : Waltraud Fritsch, geb. Schellenbach

1966 - 1969 : Besuch der Grundschule Köln-Flittard

August 1969 : Wechsel zum Städt. Gymnasium Köln-Mülheim

Mai 1978 : Abitur

Oktober 1978 : Immatrikulation zum Studiengang Biologie
(Diplom) an der Universität zu Köln

Oktober 1980 : Vordiplom

Februar 1985 : Diplom

Seit Februar 1986: Doktorand an der Universität Bochum
Spezielle Zoologie und Parasitologie

25. 7. 1986 : Heirat mit Susanne Ahrens

18. 5. 1988 : Geburt unseres Sohnes Jan Matthias

